



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

*“Caracterización del sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) en el establecimiento del feocromocitoma y en la progresión de tumores de sistema nervioso central (SNC) en pacientes pediátricos”*

Autora: Lic. Ayelen Martin

Directora: Dra. Patricia A. Pennisi

Consejera de estudios: Dra. Ana I. Sotelo

*Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Endocrinológicas  
“Dr. César Bergadá” (CEDIE), CONICET – FEI – División de  
Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutiérrez

**- 2018 -**

*... “Aquí lo tengo ahora, en la punta de mis dedos, apenas unas líneas en una tableta, un cúmulo de células electrónicas aún indeterminadas que podrían ser abortadas muy fácilmente. Los libros nacen de un germen ínfimo, un huevecillo minúsculo, una frase, una imagen, una intuición; y crecen como cigotos, orgánicamente, célula a célula, diferenciándose en tejidos y estructuras cada vez más complejas, hasta llegar a convertirse en una criatura completa y a menudo inesperada” ...*

La ridícula idea de no volver a verte  
Rosa Montero

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, la Dra. Patricia Pennisi, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y confiar en mí desde mis comienzos como estudiante... como pasó el tiempo!!! Gracias Pato por enseñarme, por guiarme, por saber entenderme, por alentarme para superarme día a día, por el acompañamiento continuo de todos estos años. Muchas gracias por confiar en mí, por todo tu esfuerzo y dedicación, por la garra que le ponés a los proyectos que llevamos adelante. Ojalá podamos seguir construyendo juntas mucho tiempo más!

Gracias a mi consejera de estudios, la Dra. Ana Sotelo por su preocupación y su ayuda para la corrección de esta tesis.

Gracias a Celi por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, por tus enseñanzas y tu infinita paciencia. Después de muchos años nos volvemos a encontrar, esta vez desde un lugar un poco distinto, pero la esencia sigue siendo la misma. Gracias por los consejos y las correcciones!! Es muy lindo tenerte de vuelta!

A Flor, gracias por la contraparte clínica, por siempre intentar participarme en tus cosas, por preocuparte por mí, por la compañía y la complicidad cotidianas, y por el gran equipo que formamos juntas!!

A mis compañeras del laboratorio 13 gracias por el lindo ambiente laboral que supimos conseguir... que supimos conseguir (♪♪!!). Por las risas, los mates y el acompañamiento diario. Especial agradecimiento para Marian, por tu constante ayuda y dedicación con el bioterio y por las idas y vueltas a exactas. A las Cecis que ya no están en el día a día, pero siguen presentes! Gracias por tantos años compartidos, por las charlas, las risas, los experimentos, gracias por su amistad!

Muchísimas gracias a Marcela por la ayuda constante, por estar siempre dispuesta a darnos una mano, por los consejos, la compañía, la calidez y por cada una de las fotos de esta tesis. Gracias a Evelin por su buena predisposición siempre y por ayudarme a ponerle color al manuscrito!

Gracias a Mariana Gutierrez por ayudarme con la mutagénesis, gracias por la buena onda, por estar siempre presente para darme una mano o prestarme una oreja!

A los directivos del CEDIE, Dr. Rodolfo Rey y al Dr. Ignacio Bergadá, gracias por permitirme realizar mi tesis doctoral en el instituto y por las oportunidades brindadas todos estos años para poder comunicar nuestro trabajo.

A la Dra. Stella Campo, por las gestiones realizadas para que se pudiera concretar mi asistencia al curso de Biología Molecular en el Instituto Pasteur en París, una de las experiencias más ricas a nivel profesional y personal de estos años de trabajo.

Muchas gracias a Mercedes por su dedicación, por preocuparse de que todo funcione como es debido. A ella y a Dora gracias por el mantenimiento del cuarto de cultivo en excelente estado, indispensable para poder realizar los experimentos.

A las chicas del laboratorio de Biología Celular Gonadal, por la ayuda con los experimentos de metabolismo. Gracias Fernanda por la ayuda para planificarlos.

Gracias a todos los integrantes del CEDIE, por la compañía de todos estos años, por su buena predisposición y generosidad.

En lo personal quisiera agradecer a mis amigas de San Pedro, Cami, Yas, Maca y Euge. Gracias por acompañarme, por entenderme, por estar siempre presentes. Porque, aunque no nos veamos a diario sabemos que nos tenemos. Por el gran apoyo que significan para mí... por que las amigas si se eligen... Una y mil veces! Las quiero!

Gracias a los amigos que me dejó la facultad: Naty, Martu, las Emis, Joha, Juli y Guido. Por compartir conmigo la profesión, los chistes biológicos y tantas anécdotas. Gracias porque, aunque pase tiempo sin vernos cuando nos juntamos existe la misma frescura y cotidianeidad de cuando casi-habitábamos el pabellón 2 de la FCEyN.

A mi familia le dedico esta tesis.

A mi hermana, compañera de la vida, gracias por compartir, por escucharme, por hacerme reír. Te admiro en cada una de las cosas que hacés.. mi pequeña gigante! Gracias por ser vos! Te quiero mucho.

A mi mamá y mi papá, gracias por guiarme, por el apoyo permanente, por preocuparse por mí, por el esfuerzo que hacen día a día por nosotras. Gracias por confiar en mí y acompañarme en mis elecciones. Son mi ejemplo. Los quiero infinitamente.

A Rafa, gracias por todos estos años juntos, por ser mi compañero incondicional, por ayudarme todos los días a ser mejor persona. Por bancarme, sobre todo este último tiempo, y por tirar conmigo siempre para adelante. Negrito, que lindo habernos encontrado!

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral fueron publicados en Hormones and Cancer, junio 2018, volumen 9 (número de publicación 3), páginas: 205-214, titulado: **“Type 1 IGF Receptor Localization in Paediatric Gliomas: Significant Association with WHO Grading and Clinical Outcome”**.

Florencia Clément\*, **Ayelen Martin\***, Marcela Venara, Maria de Luján Calcagno, Cecilia Mathó, Silvana Maglio, Mercedes García Lombardi, Ignacio Bergadá, Patricia A Pennisi.

\*Igual contribución

# *Índice*

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
Factores de crecimiento similares a la insulina	8
Cáncer	15
Generalidades	15
Microambiente tumoral	19
Fibroblastos asociados a cáncer (FAC)	21
Células endoteliales	22
El sistema de los IGFs y cáncer	23
Modelos animales	27
Feocromocitoma	30
Tumores de sistema nervioso central	32
<b>OBJETIVOS</b>	38
MARCO DE REFERENCIA	39
HIPÓTESIS	41
Objetivo general	42
Objetivos específicos	42
<b>CAPÍTULO 1</b>	44
<b>Objetivo específico 1</b>	45
<b>Materiales y Métodos, capítulo 2</b>	46
Línea celular de feocromocitoma	47
Modelo animal de feocromocitoma	47
Animales	47
Genotipificación:	48
Modelo de feocromocitoma:	49
Cálculo de tamaño muestral:	50
Procesamiento histológico	50
Estudio por inmunohistoquímica (IHQ):	50
Cultivos Primarios	52
Ensayos de proliferación celular con medios condicionados:	53
Ensayos de proliferación celular en matriz diferencial:	54
Proliferación celular por incorporación de bromodesoxiuridina	54
Muerte celular	55

Evaluación de la expresión proteica.....	55
Evaluación de la expresión génica.....	56
<b>Resultados, capítulo 2</b> .....	58
Estudios in vivo.....	59
La deficiencia local del IGF-1R modifica la incidencia tumoral.....	59
Características histológicas.....	62
Estudios in vitro.....	64
Efecto de los factores solubles.....	65
Efecto de los componentes de matriz extracelular.....	67
Expresión de integrinas en las células tumorales.....	72
<b>Discusión, capítulo 1</b> .....	74
Resumen y conclusiones, capítulo 1.....	81
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	83
<b>Objetivo específico 2</b> .....	84
<b>Materiales y métodos, capítulo 2</b> .....	85
Pacientes:.....	86
Obtención y procesamiento de tejidos humanos.....	87
Línea celular de glioblastoma.....	87
Establecimiento de líneas celulares con sobreexpresión del IGF-1R.....	87
Establecimiento de líneas celulares con IGF-1R no nuclear.....	88
Estímulo con IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1).....	89
Inhibición del IGF-1R.....	90
Muerte celular.....	90
Translocación del IGF-1R al núcleo.....	90
Inmunofluorescencia.....	91
Ensayos de migración.....	92
Medición de la producción de lactato en cultivos celulares.....	92
Medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	93
Estudio de la formación de gotas de lípidos.....	93
Evaluación de la expresión génica.....	93
Evaluación de la expresión de las isoformas del receptor de insulina.....	94
Evaluación de la expresión proteica.....	95
Modelo animal de glioblastoma.....	96
Cálculo del tamaño muestral.....	96



Procesamiento histológico de tumores murinos .....	97
Tinción de PAS.....	97
Tricómico de Masson modificado .....	97
Impregnación con plata .....	97
<b>Resultados, capítulo 2</b> .....	98
Estudios con muestras de pacientes.....	99
Estudios in vitro .....	103
Caracterización del sistema de los IGFs en la línea U87 .....	103
Caracterización de líneas con expresión estable del IGF-1R.....	108
Líneas con expresión estable de GFP-IGF-1R.....	108
Líneas con expresión estable de GFP-IGF-1R <sup>1025x-1100x-1120x</sup> ..	113
Efecto del IGF-1 sobre la proliferación celular y apoptosis .....	117
Efectos del IGF-1 sobre la migración celular .....	119
Efectos metabólicos del IGF-1.....	120
Estudios in vivo .....	131
<b>Discusión, capítulo 2</b> .....	139
Resumen y conclusiones, capítulo 2 .....	159
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	161
<b>RESUMEN</b> .....	164
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	168
<b>Anexos</b> .....	180

# *Abreviaturas*

**ACC** Acetil CoA carboxilasa  
**ACL** ATP citrato liasa  
**ADN** Ácido desoxirribonucleico  
**ADNc** Ácido desoxirribonucleico copia  
**AKT o PKB** Proteína quinasa B  
**ALS** Subunidad ácido lábil  
**ARN** Ácido ribonucleico  
**ARNm** Ácido ribonucleico mensajero  
**ATCC** "American Tissue Culture Collection"  
**ATP** Adenosín-5'-trifosfato  
**BrdU** Bromo deoxi uridina  
**BSA** Albúmina bovina sérica  
**CAT** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Ciclo de Krebs  
**CO<sub>2</sub>** Dióxido de carbono  
**Col I** Colágeno de tipo I  
**CRE** Recombinasa del bacteriófago P1  
**DAB** Diaminobenzidina  
**DS** Desvío estándar  
**DTT** Ditrioteitol  
**EDTA** Ácido etilén diamino tetraacético  
**EllaCre** Recombinasa embrionaria  
**ELN** Elastina  
**EMT** Transición epitelio mesenquimal  
**ERK** Quinasa regulada por señales extracelulares  
**ES** Error estándar  
**FAC** Fibroblastos asociados a cáncer

**Factor VIII** Factor de Von Willebrand

**FADH2** Dinucleótido de flavina y adenina

**FAS** ácido graso sintasa

**FEO** Feocromocitoma

**FN** Fibronectina

**GAPDH** Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

**GFP** Proteína verde fluorescente "*Green Fluorescent Protein*"

**GH** Hormona de Crecimiento

**GHRH** Hormona liberadora de Hormona de Crecimiento

**GLUTs** Transportadores de glucosa

**H&E** Coloración de Hematoxilina y Eosina

**HIF-1 $\alpha$**  Factor inducible por hipoxia-1, subunidad  $\alpha$

**HPRT** Hipxantina guanina fosforibosil transferasa

**HS** Suero de Caballo

**IDH** Isocitrato deshidrogenasa

**IGF-1** Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

**IGF-1R** Receptor de tipo 1 de factores de crecimiento similares a la insulina

**IGF-2** Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2

**IGF-2R** Receptor de tipo 2 de factores de crecimiento similares a la insulina

**IGFBPs** Proteínas transportadoras de factores de crecimiento similares a la insulina

**IGFs** Factores de crecimiento similares a la insulina

**IHQ** Inmunohistoquímica

**Ins** Insulina

**ip** Vía intraperitoneal

**IR** Receptor de insulina

**IRS 1-4:** Sustratos del receptor de insulina 1-4

**Itg** Integrina

**Kb** Kilobase

**kDa** Kilodalton

**LDH** Lactato deshidrogenasa

**LID** Ratones deficientes de IGF-1 hepático, “Liver IGF-1 deficient mice”

**M6P** Manosa 6 fosfato

**MAPKs** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MCT4** Transportador de monocarboxilatos 4

**MEC** matriz extracelular

**MEN2** Neoplasia endócrina múltiple de tipo 2

**MMPs** Metaloproteasas

**MP** Membrana plasmática

**MPC** Células de feocromocitoma murino

**mTOR** Proteína blanco de rapamicina en mamíferos

**NADH** Dinucleótido de nicotinamida y adenina

**NF1** Neurofibromatosis 1

**NLS** Secuencia de localización nuclear

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**OSI 906** Inhibidor dual del IGF-1R e IR

**Pb** Pares de bases

**pb** Pares de bases

**PBS** Tampón salino de fosfato

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDHc** Complejo de la Piruvato deshidrogenasa

**PDK** Piruvato deshidrogenasa quinasa

**PDP** Piruvato deshidrogenasa fosfatasa

**pgl** Paraganglioma

**pH** Potencial de hidrógeno

**PI3K** Fosfatidilinositol 3-quinasa

**PNMT** Enzima feniletanolamina N-metil transferasa

**POSTN** Periostina

**PTEN** fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa

**PVDF** Fluoruro de polivinilideno

**Ratones L/L** Ratones controles (*Igf-1r<sup>fl/fl</sup>*)

**Ratones L/n** Ratones con haploinsuficiencia para el receptor de IGF-1 (*Igf-1r<sup>fl/n</sup>*)

**RET** Proto-oncogén, receptor de tipo tirosina quinasa, "rearranged during transfection"

**rhIGF-1** Factor de crecimiento insulino-símil tipo 1 recombinante humano

**ROHA** Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino

**RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa para Retrotranscripción

**SDH** Succinato deshidrogenasa

**SDS** dodecilsulfato sódico

**SFB** Suero Fetal Bovino

**SHC** Proteínas con dominios de homología de Src (dominios SH2),

**SNC** Sistema Nervioso Central

**SS** Somatostatina

**SUMO**: Pequeño modificador similar a ubiquitina, "*Small Ubiquitin-like Modifier*"

**TBP** Proteína de unión a la caja TATA, "*TATA Binding Protein*"

**TEM** Transición epitelio-mesenquimal

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante beta

**TNC** Tenascina

**TRAMP** Ratones transgénicos con adenocarcinoma de próstata, “transgenic adenocarcinoma mouse prostate”

**U-87 MG** Células de glioblastoma humano (U87)

**VEGF** Factor de crecimiento del endotelio vascular

**VENIFARKO** Ratones con delección específica del IGF-1R en células endoteliales del sistema vascular

**VHL** von Hippel-Lidau

**WB** Western Blot

**WT** Condición nativa o salvaje de una proteína, “*wild type*”

# *Introducción*



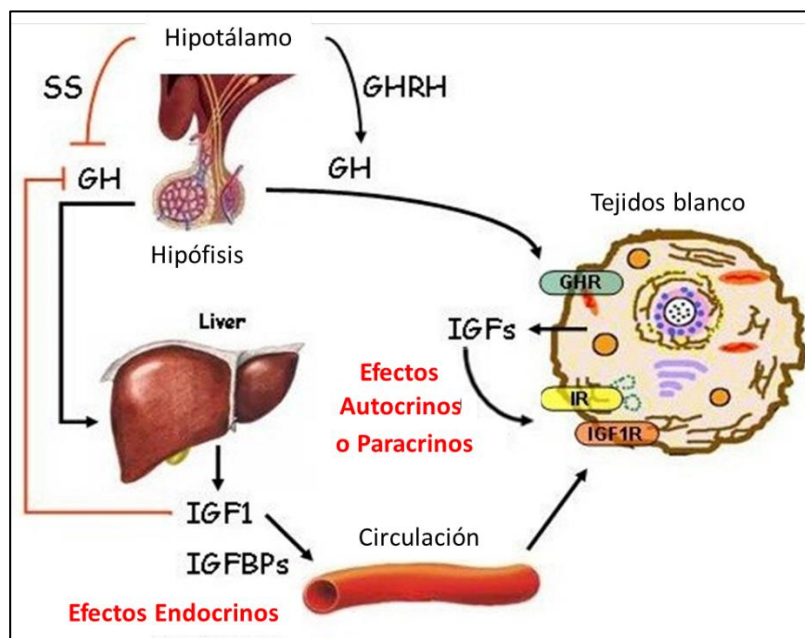
El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y división celular. El mismo consta de dos fases bien definidas: la interfase, periodo que abarca aproximadamente el 90% del ciclo y en el cual la célula duplica su tamaño a expensas de la síntesis de proteínas, lípidos y la duplicación de su material genético, y la fase de mitosis, durante la cual la célula se divide dando lugar a dos células hijas (1). Las señales que promueven el avance del ciclo celular desde un estado de quiescencia están mediadas por un grupo de péptidos colectivamente llamados factores de crecimiento. En particular, el presente trabajo abarca el estudio del sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina, involucrados en el control de diferentes procesos relacionados con el crecimiento y metabolismo celular tanto en condiciones fisiológicas como en células transformadas (2).

### **FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA**

Los *factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 e IGF-2)* son polipéptidos relacionados estructuralmente con la insulina, que juegan un papel importante tanto en la regulación de la proliferación celular como en la inhibición de la muerte celular programada o apoptosis (3). Forman parte de un sistema compuesto por 3 ligandos (IGF-1, IGF-2 e insulina), 3 receptores (IGF-1R, IR e IGF-2R) y 6 proteínas de transporte.

El **IGF-1** es sintetizado en la mayoría de los tejidos de la economía, sin embargo, los cambios en las concentraciones circulantes de este factor se deben principalmente a variaciones en su síntesis y secreción por parte del tejido hepático, que provee en los animales hasta un 80% de los valores séricos totales. El resto del IGF-1 es sintetizado periféricamente y su función es tejido específica regulando funciones celulares de manera autocrina o paracrina (4) (fig 1). La regulación endócrina de la síntesis de IGF-1 involucra al eje somatotrófico. En este caso, el hígado sintetiza la mayoría del IGF-1 circulante en respuesta al estímulo de la hormona de crecimiento (GH), principal

mediador del crecimiento postnatal. La GH es producida por la hipófisis anterior y su secreción de manera pulsátil está en parte controlada por dos neuropéptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SS) (5). La GHRH actúa estimulando la síntesis y secreción de GH, mientras que la SS la inhibe. A su vez, el IGF-1 estimula negativamente la producción de GH al inhibir su secreción de la hipófisis, estimular la síntesis de SS e inhibir la secreción de GHRH (5) (fig 1).

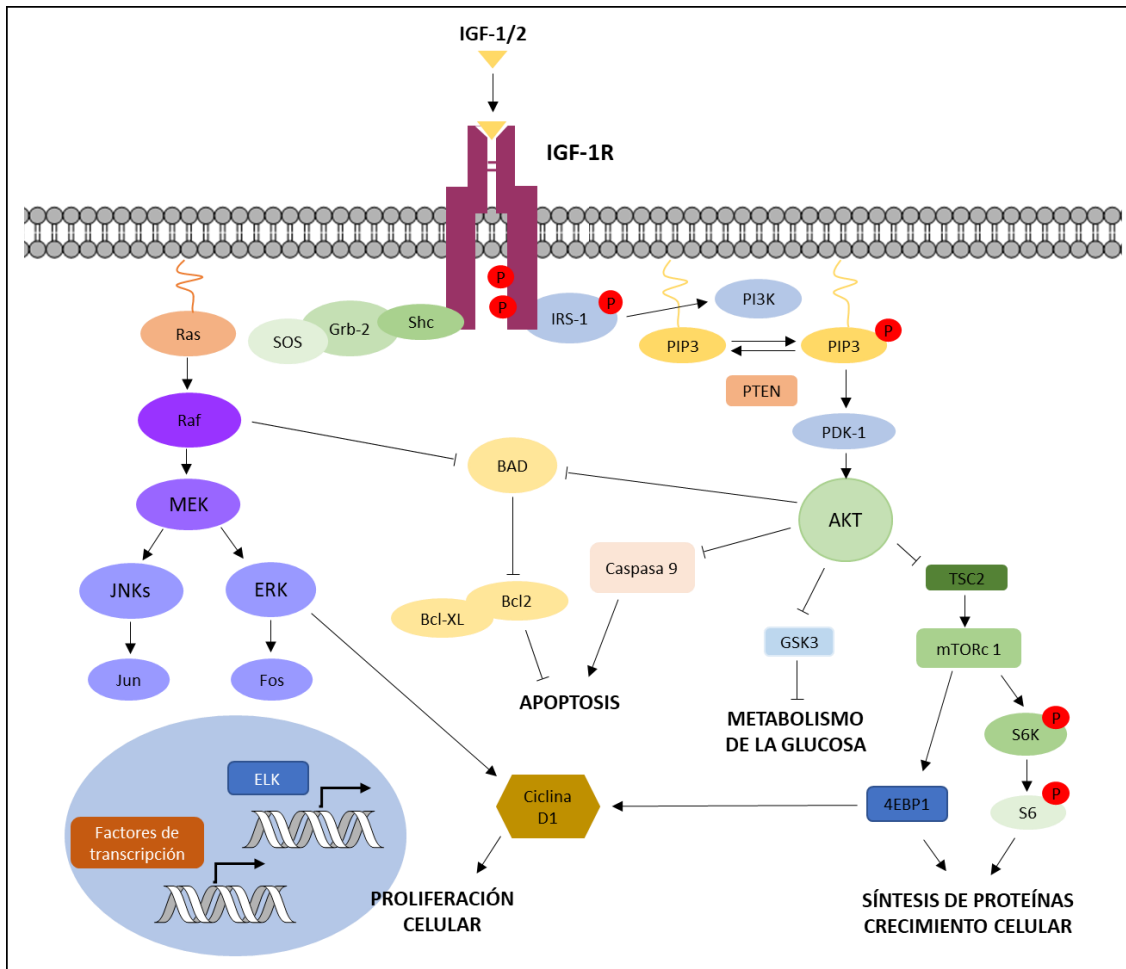


**Figura 1: Acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas de los IGFs.** A nivel orgánico, el IGF-1 circulante es mayormente producido en el hígado, bajo estímulo de GH. El IGF-1 también puede ser localmente producido, tanto de manera autocrina como paracrina (adaptado de Pivonello, 2014 (5)).

El **IGF-2** se expresa preferencialmente durante la embriogénesis y el desarrollo fetal cumpliendo en estas etapas un papel importante en el crecimiento celular, la diferenciación y el metabolismo (6). En la vida adulta el IGF-2 circulante predomina sobre el IGF-1, estando en concentraciones hasta 3 veces mayores (7). Los factores genéticos tienen un importante rol en la regulación de la producción de IGF-2. La

transcripción de este factor está regulada por “imprinting”, mecanismo epigenético que restringe la expresión del IGF-2 al alelo paterno quedando el alelo materno silenciado. De esta manera se previene la expresión excesiva de IGF-2 que podría llevar a la proliferación descontrolada y el desarrollo de neoplasias (8).

Los IGFs cumplen la mayoría de sus acciones mediante su interacción con el receptor de tipo I (IGF-1R) (9). El **IGF-1R** es un receptor con actividad de tirosina quinasa compuesto por dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$  unidas entre sí por puentes disulfuro (10). Las subunidades  $\alpha$  son totalmente extracelulares y contienen un dominio rico en cisteínas necesario para la unión con los ligandos. Las subunidades  $\beta$  tienen una porción transmembrana con aminoácidos hidrofóbicos y una porción citoplasmática que contiene el dominio tirosina quinasa (9). Una vez activado por sus ligandos (IGF-1, IGF-2) el IGF-1R cambia su conformación, lo que le permite unir una molécula de ATP y autofosforilarse en residuos tirosina de sus cadenas  $\beta$ . De esta manera se desencadena su actividad intrínseca de tirosina quinasa, al reclutar y fosforilar proteínas adaptadoras como IRS (sustratos del receptor de insulina) y Shc (proteínas con dominio de homología Src). La fosforilación de IRS activa la vía de fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) que termina con la activación de la proteína quinasa B o AKT (PKB o AKT). Por otro lado, la fosforilación de Shc activa la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (11). La activación de las vías descritas resulta en una variedad de respuestas como la proliferación celular, diferenciación, activación del metabolismo, migración y la inhibición de la apoptosis (12) (fig 2).



**Figura 2: Representación de las principales vías de señalización.** Se grafican los diferentes componentes de las vías de PI3K/AKT y MAPK con sus efectos biológicos (adaptada de Lodhia, 2015 (14)). IGF-1: Factor de crecimiento insulino- similar tipo 1; IGF-1R: Receptor de tipo 1 del factor de crecimiento insulino-símil tipo 1; F: fosforilación; IRS-1: sustrato del receptor de insulina-1; Shc: proteína que contiene dominios de homología de Src (SH2); PI3K: fosfatidilinositol 3'quinasa; 4-5PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, PDK2 y PKB o AKT: serina-treonina quinasa citosólica; PH: dominios de homología con plecstrina; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; GEFs: factores de intercambio de nucleótidos de guanina; GAPs: proteínas activadoras de GTPasas; Nf-1: Neurofibromina-1; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos.

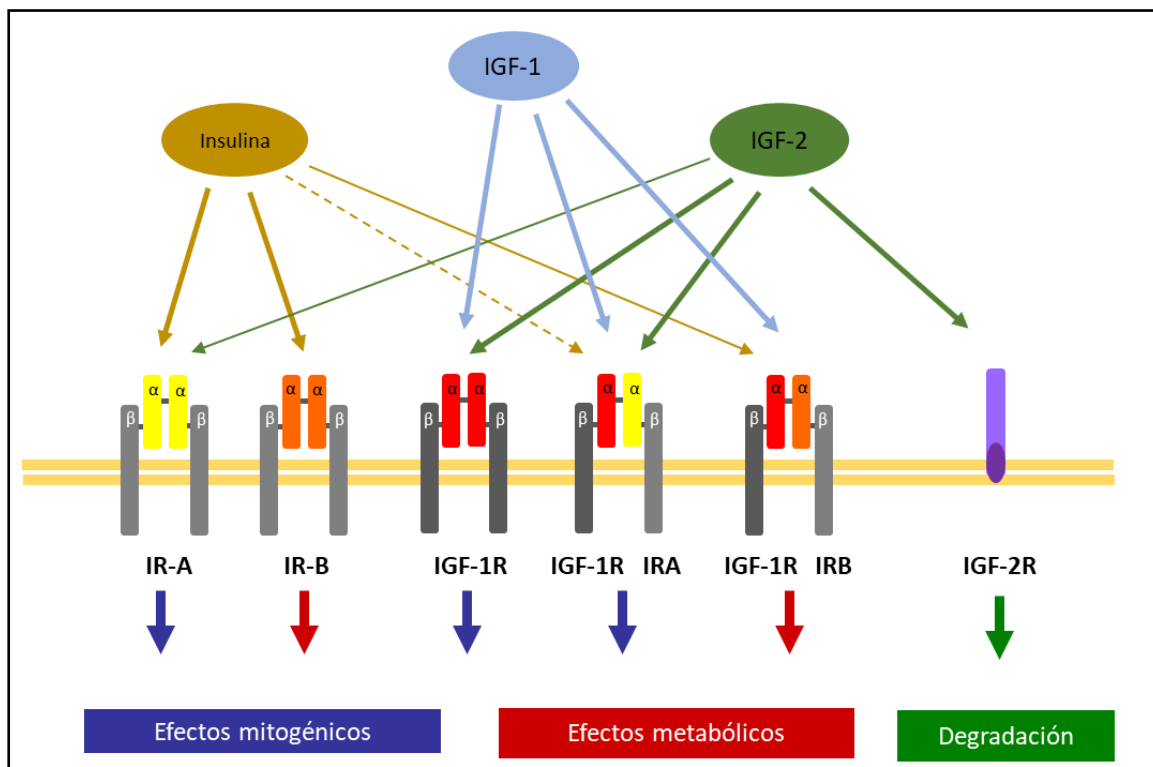
El **receptor de insulina (IR)** puede presentarse en dos isoformas, IR<sub>A</sub> o IR<sub>B</sub>. La diferencia entre los mismos se debe al corte y empalme alternativo en la región carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  que corresponde al exón 11 del dicho gen. Por consiguiente, la inclusión de la región de 36 pb da lugar a la isoforma B del IR, mientras que su exclusión genera la isoforma A, que resulta 12 aminoácidos más corta (13).

Dada la alta homología estructural que tiene el IR con el IGF-1R, en algunos tipos celulares donde se expresan ambos receptores pueden formarse **receptores híbridos** a partir la heterodimerización de un hemirreceptor del IR y uno del IGF-1R (9) (fig 3). La heterodimerización ocurre con la misma eficiencia que la homodimerización, y las características funcionales son diferentes dependiendo de la isoforma de IR que se incorpore en los heterodímeros. Además, estos receptores híbridos tienen mayor afinidad por IGF-1 o IGF-2 que por insulina, por lo que la presencia de receptores híbridos en la membrana celular podría disminuir o inhibir las acciones metabólicas de la insulina en comparación con aquellas células que expresen homodímeros del IR y/o IGF-1R (9).

El IGF-2 puede unirse a la isoforma A (IR<sub>A</sub>), mediando efectos mitogénicos como la proliferación celular y la protección de la apoptosis, en contraste con los efectos metabólicos mediados por la insulina a través de la isoforma B del IR (13) (fig 3).

El último de los receptores del sistema de los IGFs es **el IGF-2R, receptor de tipo 2/manosa 6 fosfato (M6P)** que no tiene dominios de señalización intracitoplasmáticos y está involucrado en el balance de los niveles de IGF-2 circulante, ya que cuando éste se une al receptor el complejo es endocitado para su degradación lisosomal (15) (fig 3).

A diferencia de la insulina, los IGFs circulan unidos a proteínas de transporte específicas, que los unen con alta afinidad y modulan su biodisponibilidad (16). Estas proteínas se denominan **proteínas de transporte de los IGFs o IGFBPs** y sus funciones son no sólo transportar a los IGFs en los fluidos biológicos formando diferentes complejos, sino también modular las acciones biológicas de los mismos. Se han descrito, hasta el presente, 6 proteínas bien caracterizadas denominadas IGBP1 a 6 que tienen una homología estructural conservada en la región amino-terminal codificada por el primer exón del gen de la familia de las BPs (17).

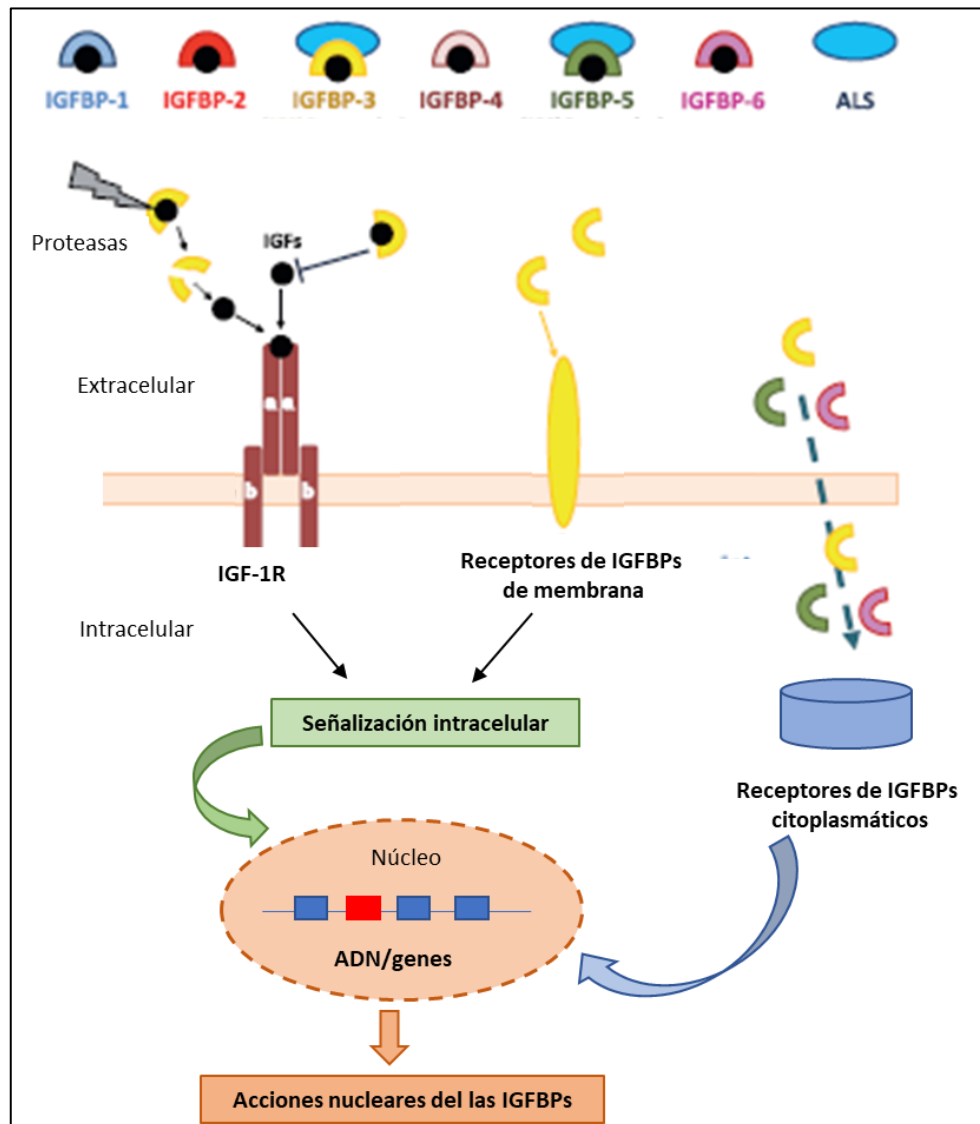


**Figura 3: Representación de la interacción de los IGFs y la Insulina con los diferentes receptores.** Se grafican los diferentes tipos de receptores de los IGFs, insulina e híbridos y las uniones con sus ligandos marcadas con las líneas y flechas de diferentes colores indicando los grosores de las líneas las afinidades de los receptores por los ligandos. Además, se representan los diferentes efectos biológicos generados por la activación de los diferentes receptores. (adaptado de Livingston, 2013 (8)).

Las IGFBPs circulan en el plasma en distintas cantidades, siendo la IGFBP-3 la más abundante en circulación (4). Aproximadamente el 75% de los IGFs circulan formando complejos ternarios de 150-200 KDa que incluyen a los IGFs, IGFBP-3/5 y a la Subunidad Ácido-Lábil o ALS (fig 4). En el hígado, los hepatocitos son la fuente principal de producción de IGFs y ALS mientras que IGFBP-3 se sintetiza preferencialmente en las venas portales y en el endotelio sinusoidal (18). El restante 25% de los IGFs circulantes se distribuye en complejos binarios (IGFs- IGFBPs) y sólo entre el 1 y el 5 % circula libre de unión a IGFBPs. Los complejos ternarios (IGFs/IGFBPs/ALS) actúan como reservorios de IGFs ya que no pueden atravesar las barreras del endotelio

vascular, prolongando la vida media de los IGFs (19,20). La actividad biológica de los IGFs en los tejidos está determinada por mecanismos que involucran la disociación del complejo o la proteólisis de las IGFBPs para la liberación de los IGFs (17).

Por otra parte, existen evidencias de la acción de las IGFBPs independiente de IGFs, que no involucran su unión a dichos factores o la activación del IGF-1R (fig 4). Los mecanismos por los cuales cumplen estas funciones aún no han sido completamente dilucidados (21). Uno de estos mecanismos consiste en la translocación al núcleo y la consecuente activación transcripcional de genes (fig 4). Si bien existen evidencias de interacción entre proteínas nucleares e IGFBPs (22)(23), hasta el momento no está claro si estas interacciones pueden resultar en la unión de las IGFBPs al ADN y/o la activación transcripcional de genes específicos. Recientemente se ha descrito que la localización nuclear de IGFBP-2 en células de neuroblastoma estimula la transcripción de VEGF en estas células (24).



**Figura 4: Representación del sistema de IGFBPs:** Se grafican las diferentes proteínas de transporte para los IGFs desde la 1 hasta la 6 (IGFBP1-6) y los complejos ternarios formados por la subunidad ácido-lábil (ALS). Además, se incluyen las proteasas y las acciones de las IGFBPs independiente de IGFs (adaptado de Russo, 2015 (25)).

## CÁNCER

### Generalidades

La *carcinogénesis* es un proceso de múltiples pasos por el cual células normales se transforman en células cancerosas. Esto se debe al desbalance en los circuitos que controlan la proliferación y homeostasis de las células normales (26). Los tejidos



normales controlan estrictamente la producción y liberación de señales que gobiernan la entrada y la progresión del ciclo de crecimiento y división celular asegurando el correcto número de células, así como la arquitectura y función de los tejidos. En las células cancerosas se altera esta regulación, lo cual determina un destino diferente al de las células normales (27).

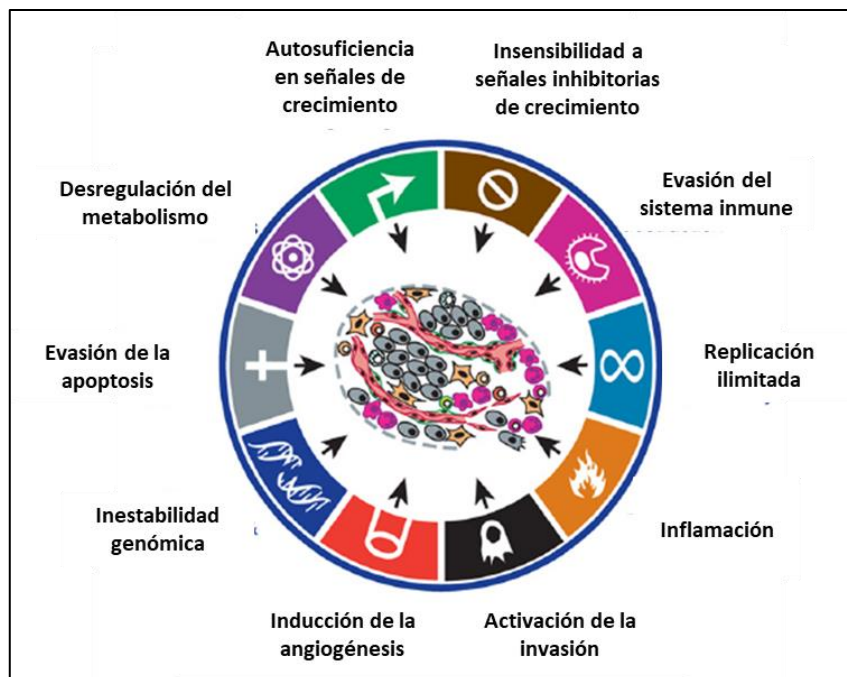
Las alteraciones bioquímicas y moleculares son comunes a la mayoría de los cánceres estudiados, por lo que se ha sugerido que los distintos tipos de células cancerosas podrían adquirir las mismas capacidades funcionales para el desarrollo tumoral. Las características descritas consideradas como fundamentales para adquirir el fenotipo tumoral han sido enumeradas por Hannahan y colaboradores en 2000. Dentro de las mismas se encuentran las transformaciones sufridas por las células que las llevan a la inmortalidad pudiendo replicarse ilimitadamente, la capacidad de generar señales de proliferación celular sostenida y la insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, la evasión de la apoptosis, la capacidad para la neoformación de vasos (angiogénesis) y la posibilidad de invadir y colonizar nuevos tejidos (metástasis) (26).

En una versión más actualizada los autores proponen que la posibilidad de que una célula normal se convierta en cancerosa depende del desarrollo de la inestabilidad genómica que permite que se generen y acumulen mutaciones y del estado inflamatorio característico de las lesiones pre-malignas auspiciado por las células del sistema inmunológico (27).

Una vez que las células tumorigénicas están establecidas, para poder proliferar necesitan poder evadir el sistema inmune, tanto a las células de la respuesta inmune innata como específica. Las células menos inmunogénicas, o aquellas con la capacidad de inactivar el sistema inmune para no ser eliminadas son las que suelen persistir, crecer y generar tumores sólidos (28,29).

Por otro lado, para mantener su continuo crecimiento y proliferación, las células tumorales suelen reprogramar su metabolismo reemplazando los caminos metabólicos que operan en los tejidos normales por caminos alternativos (30).

Las características antes mencionadas son adquiridas en los distintos tipos tumorales mediante distintos mecanismos y en varios momentos durante el proceso de múltiples pasos que es el desarrollo tumoral y se resumen en la figura 5.



**Figura 5: Capacidades adquiridas por las células tumorales:** Se grafican las diferentes capacidades adquiridas por la mayoría de las células tumorales durante su desarrollo. Las mismas pueden presentarse mediante variados mecanismos y en variados momentos durante el proceso de tumorigénesis. (adaptado de Hanahan, 2011 (27)).

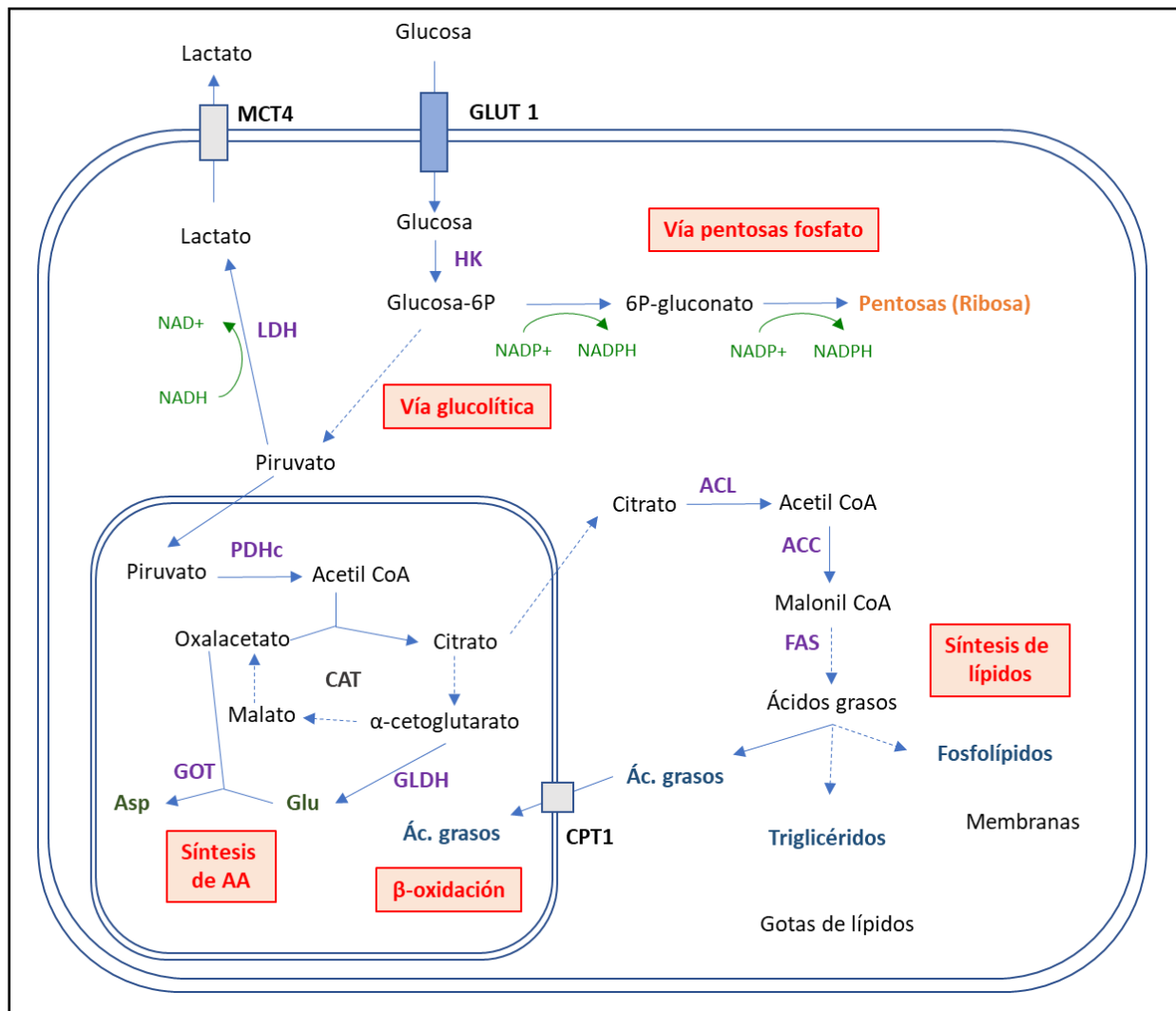
Los cambios en el metabolismo de las células tumorales, como ya fue mencionado, son necesarios para mantener la proliferación crónica y descontrolada característica de las neoplasias. Generalmente, en condiciones aeróbicas las células procesan la glucosa hasta piruvato, que ingresa luego a la mitocondria en forma de acetil-CoA para incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) produciendo equivalentes de

reducción (NADH y FADH<sub>2</sub>) que luego proveerán energía a través de la cadena respiratoria (31). En el caso de las células tumorales, la obtención de energía está basada en la metabolización de la glucosa para obtener lactato proceso conocido como glucólisis aeróbica, descrita ya en los años 50 como efecto Warburg, en honor a quien lo describió (32). Si bien la glucólisis aeróbica es menos eficiente que el metabolismo oxidativo (2 vs 36 moléculas ATP por molécula de glucosa), es 100 veces más rápida y puede cubrir los requerimientos energéticos a corto tiempo a expensas de un mayor consumo de glucosa.

Una posible explicación de este fenómeno y por qué favorece a las células cancerígenas es que permite cumplir con requerimientos metabólicos más allá de la producción de energía. Así, se favorece que los intermediarios derivados del ciclo de los CAT sean dirigidos a varias vías biosintéticas como la síntesis de azúcares para formar nucleótidos (a través de la vía de las pentosas) o la síntesis de lípidos y aminoácidos. Como consecuencia los cambios en el metabolismo permiten llevar a cabo vías anabólicas que sostienen la proliferación celular (33).

Por otro lado, el NAD<sup>+</sup> usualmente regenerado mediante la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria, es en la glucólisis aeróbica re-oxidado por la acción de la enzima LDH, que convierte el piruvato a lactato permitiendo que la glucólisis pueda continuar (34). El lactato, producto final generado en este proceso, es luego expulsado de la célula por el transportador de monocarboxilatos MCT4 para mantener el pH celular, contribuyendo a la acidez característica de ambiente donde se encuentran las células tumorales y promoviendo la migración celular (35). En algunos casos el lactato también sirve como nutriente de otros tipos celulares.

Las vías activadas en este proceso se esquematizan en la figura 6.



**Figura 6: Vías metabólicas activadas en células tumorales:** Se representan las vías que típicamente se encuentran activadas en el metabolismo de las células tumorales. Las líneas punteadas representan reacciones con más de un paso que no se incluyen en el presente gráfico (adaptado de Swinnen, 2006 (40)). HK: hexoquinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, PDHc: complejo de la piruvato deshidrogenasa, CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos, GLDH: gliceraldehido deshidrogenasa, GOT: aspartato aminotransferasa, ACL: ATP citrato liasa, ACC: acetil-CoA carboxilasa, FAS: ácido graso sintasa, CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1.

### Microambiente tumoral

Es importante que los tumores sean considerados como órganos o tejidos complejos donde son vitales las interacciones entre las células tumorales y las células y componentes del estroma. La proliferación de las células tumorales provoca cambios en el microambiente

que las rodea tales como la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y el aumento en la actividad proteolítica, así como en la biodisponibilidad de factores de crecimiento. Este “estroma reactivo” además favorece la neovascularización y el influjo de células inflamatorias al lugar de desarrollo (36–38). Queda de manifiesto que para que la tumorigénesis sea exitosa es necesario un microambiente tumoral permisivo (39).

### Matriz extracelular

Las interacciones de las células cancerosas con el microambiente tumoral están influenciadas tanto por las propiedades estructurales y bioquímicas de la matriz extracelular (MEC) como por las células que en ella residen (fibroblastos y células endoteliales) (41). La interacción bidireccional entre ambos tipos celulares es crucial para la progresión del tumor (42).

La MEC está compuesta por una red de proteínas (principalmente colágeno y elastina), proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina y laminina) que difieren entre los tejidos en su composición y estructura. El tamaño y la densidad de la red de fibras determinan las propiedades mecánicas y morfológicas de la MEC, afectando su interacción con las células que residen en la matriz. En el caso de las interacciones entre las células tumorales y la MEC, la arquitectura tiene un impacto directo sobre la resistencia que encuentran las células tumorales para migrar (43). Además, la organización de las fibras de colágeno determina la estrategia de migración utilizada por las células tumorales (44), que puede ser con movimientos ameboides (como los utilizados por los leucocitos) o con movimientos de tipo mesenquimático. Este último modo de migración se logra por un proceso llamado transición epitelio-mesenquimal (TEM) inducido por una variedad de señales que reciben las células tumorales que hacen que aumente la capacidad de invadir y la resistencia a la apoptosis (45).

Asimismo, las células tumorales censan la composición de la MEC a través de interacciones mediadas por integrinas que reconocen sustratos específicos y adhesiones focales para modificar sus propiedades mecánicas generando condiciones favorables para la adhesión, evitando la muerte celular por falta de anclaje (anoikis) y para la migración celular, muy importante en los procesos de metástasis (46). Recientemente se ha demostrado que la formación de tumores mamarios está acompañada por el entrecruzamiento exacerbado de fibras de colágeno, lo que produce un endurecimiento de la MEC con un aumento en la formación de uniones focales por parte de las células tumorales (36). Esta remodelación en la disposición de las fibras de la MEC sería la responsable de la mayor rigidez característica del tejido tumoral. Además de influenciar la migración de las células cancerosas, la MEC también afecta varias vías regulatorias mediante la modulación de la disponibilidad de factores de crecimiento (36).

#### Fibroblastos asociados a cáncer (FAC)

Muchos de los cambios de la MEC son debidos a la activación de los fibroblastos residentes en el estroma tumoral, que aumentan su número y adquieren características diferenciales (38). Las señales que median la activación de los fibroblastos no se conocen completamente. In vitro se ha demostrado que los fibroblastos se pueden activar bajo estímulo del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), involucrado también en los procesos de cicatrización de heridas y fibrosis de tejidos (47).

El estroma reactivo de un tumor está asociado con el aumento en el número y la actividad de los fibroblastos, con el consecuente incremento en la deposición de colágeno tipo I y fibronectina (en menor cantidad) (38). Los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) pueden ser identificados por la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso, por lo cual también se los llama miofibroblastos. Los FAC se caracterizan por secretar una

mayor cantidad de componentes de la matriz extracelular y por proliferar más que los fibroblastos en condiciones fisiológicas.

Además, participan en todas las etapas del desarrollo tumoral secretando proteínas que estimulan la capacidad de invadir de las células cancerígenas, la remodelación de tejidos y la angiogénesis (48). En línea con estos conceptos, se demostró una disminución significativa en el crecimiento tumoral y en el número de metástasis en ratones deficientes de fibroblastos (42). Los FAC, además de secretar sustancias que afectan directamente la motilidad celular, también son fuente de proteasas que degradan la matriz extracelular, llamadas metaloproteasas (MMPs). De esta manera, estas enzimas facilitan que las células tumorales puedan migrar desde el sitio primario hacia otros tejidos en el proceso de metástasis (38).

#### Células endoteliales

Puntualmente en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis se observa una reorganización de las células endoteliales, impulsada por factores secretados tanto por las células tumorales como por las células del estoma tumoral (37,49). El factor más importante que controla la morfogénesis de los vasos es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), que es requerido para la diferenciación y quimiotaxis de los precursores de las células endoteliales. El VEGF puede ser secretado tanto por las células tumorales como por los FAC. Su unión al receptor en las células endoteliales promueve la proliferación y diferenciación de las mismas, que adquieren propiedades invasivas y migratorias para dar lugar a la formación de nuevos vasos (50). En condiciones de baja concentración de oxígeno o hipoxia generada por la ineficiente vascularización de los tumores sólidos, se activan diversos mecanismos que inducen la expresión de factores pro-angiogénicos, dentro de los cuales se destaca a los factores inducidos por hipoxia (HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ ). Estos factores a su vez promueven la expresión de VEGF que estimula la angiogénesis (51).

La vasculatura tumoral formada bajo estímulo de VEGF es estructural y funcionalmente anormal dado que no se organiza en arteriolas, capilares o vénulas. Se pueden observar vasos terminales y brotes vasculares espiralados, con excesivas anastomosis. El flujo sanguíneo por los mismos tampoco es normal observándose una mayor permeabilidad de estos capilares que derivan en frecuentes microhemorragias (52).

Teniendo esto en cuenta, se hace evidente que los cambios patológicos que se dan en el microambiente tumoral son tan importantes para el progreso de la enfermedad como las características del tumor en sí. Las señales que facilitan todos los procesos descritos para el establecimiento y posterior desarrollo tumoral están lideradas en su mayoría por factores de crecimiento. Estos, actuando sobre receptores específicos, en general del tipo tirosina quinasa, desencadenan cascadas de señalización intracelular que regulan la progresión del ciclo celular y crecimiento, y que pueden influenciar el metabolismo y la supervivencia celular.

## **EL SISTEMA DE LOS IGFS Y CÁNCER**

La disrupción del balance entre los distintos componentes del sistema de los IGFS (ligandos, receptores e IGFBPs), y su vinculación con el crecimiento, mantenimiento y progresión tumoral ha sido demostrada en diferentes tipos tumorales (53–55) y se ha sugerido que dicho sistema tendría un rol en las etapas tempranas de transformación celular y carcinogénesis (56,57).

Una posible teoría ha sido propuesta por Pollak en 2004, según la cual los niveles elevados de IGF-1 podrían facilitar la sobrevida de células madres que sufrieron algún tipo de daño genético o “*hit*” ya sea inhibiendo la apoptosis y/o acelerando la tasa de proliferación, incrementándose de esta manera la cantidad de células dañadas que puedan sufrir sucesivos “*hits*” dando lugar a la iniciación tumoral (55). Estudios recientes



han sugerido que los individuos con niveles circulantes de IGF-1 en el límite superior del rango normal tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon, próstata, mama, pulmón y vejiga (58–61).

Por otro lado, se ha relacionado al sistema de los IGFs con la transformación celular en diversos modelos *in vitro*. DeAngelis y colaboradores demostraron que se requiere del IGF-1R funcional intacto para la transformación mediada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en fibroblastos embrionarios murinos (células 3T3-*like*) (62). Kaleko y colaboradores han demostrado que la sobreexpresión de IGF-1R promueve la transformación neoplásica de diversas líneas celulares, evidenciada por la capacidad de las células en cultivo de formar colonias (63). Dicha sobreexpresión también fomenta el crecimiento celular sin necesidad de anclaje a la matriz y es capaz de promover el crecimiento tumoral *in vivo*. Por otro lado, la sobreexpresión constitutiva del IGF-1R en una línea celular mamaria normal (células MCF-10A) activa su transformación tumorigénica (64). Para mencionar un ejemplo más, en líneas celulares de melanoma, en las cuales se evidencia la expresión de IGF-1 como de su receptor, el estímulo con IGF-1 promueve un aumento en la proliferación de este tipo celular de manera dependiente de la dosis. Además, el bloqueo del IGF-1R con un anticuerpo específico provocó una marcada disminución en la proliferación de dichas células (65). En cuanto al IGF-1R, se ha demostrado su sobreexpresión en numerosos tipos de cáncer desde glioblastoma y neuroblastoma (66) hasta cáncer de mama (67,68) entre otros. Por ejemplo, se demostró un aumento significativo tanto en los niveles del ARN mensajero del IGF-1R como en los niveles de expresión de la proteína en cáncer de próstata comparado con el tejido epitelial normal de la próstata (69).

Recientemente se ha descripto además la localización nuclear del IGF-1R, clásicamente considerado de membrana, en células tanto normales como tumorales (70,71). A pesar de no tener secuencias típicas de las proteínas que son traslocadas al

núcleo (NLS) se ha verificado la presencia en este compartimento del receptor intacto. El mecanismo de translocación ha comenzado a dilucidarse, el mismo involucra la modificación de 3 residuos de lisina muy conservados, localizados en la subunidad beta del IGF-1R en las posiciones 1025, 1100 y 1120 de la proteína madura (71). Para que se lleve a cabo dicha modificación, SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) debe ser activado por una enzima activadora (SUMO E1). El complejo luego es transferido a una segunda enzima conjugadora llamada UBC9 (SUMO E2), para ser finalmente unido a los residuos de lisina en la proteína *target* (72). Por otro lado, la fosforilación del receptor es un requisito necesario para la traslocación al núcleo, demostrando que esta localización sería en respuesta a estímulos externos más que un tráfico intracelular no regulado por el entorno celular (70,71). Estudios más recientes han demostrado que para la traslocación, luego de la fosforilación, es necesario que el IGF-1R se asocie a una subunidad específica de la dinactina (proteína involucrada en el transporte intracelular) llamada p150Glued, encargada de transportarlo hasta el poro nuclear. En ese lugar, para que el IGF-1R pueda atravesar el complejo del poro nuclear, debe interactuar con la importina  $\beta$  y asociarse con la enzima, RanBP2 que tiene actividad de SUMO E3 ligasa (73). Los autores de este trabajo proponen que para que el IGF-1R pueda interactuar con RanBP2 el receptor debe estar previamente SUMOilado.

Si bien aún no se conoce por completo la función de este receptor en el núcleo, algunos autores ya han demostrado su asociación con mal pronóstico en diferentes tipos tumorales (74–76). Algunos trabajos han demostrado que el IGF-1R en el núcleo se une al DNA, donde actuaría como un activador de la transcripción de ciertos genes (71). Warsito y colaboradores han demostrado la asociación en el núcleo del IGF-1R con el factor de transcripción LEF1, incrementando la actividad de los promotores de genes que responden a LEF1 como son ciclina D1, involucrada en el avance del ciclo celular

de fase G1 a fase S, y axina 2 que participa en estabilización de la  $\beta$ -catenina en la vía de señalización de Wnt (77).

Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno es uno de los factores limitantes en el crecimiento del tumor ya que a medida que este se expande comienzan a generarse gradientes de difusión, tanto de oxígeno generándose hipoxia, como de nutrientes, obteniéndose por lo general una masa central tumoral necrótica. Estas condiciones pueden ser superadas mediante el desarrollo de nuevos vasos (50). La hipoxia es registrada por las células determinando el aumento de expresión del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), factor de transcripción que se trasloca al núcleo donde regula la expresión de genes como por ejemplo el VEGF que es el principal factor angiogénico secretado por los tumores (78–80).

Aunque la hipoxia es el mayor estímulo para la angiogénesis se ha demostrado que los IGFs están involucrados más tempranamente en este proceso. Se sabe que el IGF-1R está presente en células endoteliales y que la acción de IGF-1 sobre estas es estimular la migración y la formación de estructuras tubulares (81). En cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón, se observó que tanto IGF-1 como IGF-2 inducen la expresión del HIF-1 $\alpha$  tanto en ausencia de hipoxia o en condiciones de cultivo de baja densidad celular (82).

Además de la neovascularización, las células tumorales también pueden inducir la formación de nuevos vasos linfáticos y este proceso es conocido como linfangiogénesis. Recientemente se ha identificado al IGF-1R como regulador positivo de la producción de VEGF-C, principal mediador de la linfangiogénesis (83).

En cuanto al metabolismo, se sabe que las células malignas dejan de utilizar la fosforilación oxidativa para producir ATP, cambiando el proceso por la vía glucolítica. Esto es conocido como efecto Warburg y tiene como consecuencia la disminución en la producción de ATP y la acidificación característica de los procesos tumorales (32).

En este escenario los IGFs tienen un papel importante ya que el IGF-1 activa la vía de PI3K-AKT estimulando la obtención de piruvato a partir de glucosa y favoreciendo la producción de energía en las células tumorales mediante esta vía (84). Por otro lado, se ha descrito que el estímulo con IGF-1 aumenta la expresión del transportador de glucosa GLUT1 en diversos tipos celulares, modulando la captación de la misma (85). Por último, se ha documentado el rol del sistema de los IGFs en el proceso de metástasis de diferentes tipos de cánceres en el humano. Por ejemplo, se demostró un aumento significativo tanto en los niveles del ARN mensajero del IGF-1R como en los niveles de expresión de la proteína en cáncer de próstata y sus metástasis óseas comparado con el tejido epitelial normal de la próstata (69). En cáncer de colon, se mostró un incremento gradual en la expresión del IGF-IR durante la progresión tumoral desde adenomas del colon hasta adenocarcinomas primarios y metástasis (86). Asimismo, se encontró una correlación significativa entre niveles elevados de expresión del IGF-1R y el riesgo de metástasis en hígado con la consecuente muerte en pacientes con melanoma uveal (87).

### **Modelos animales**

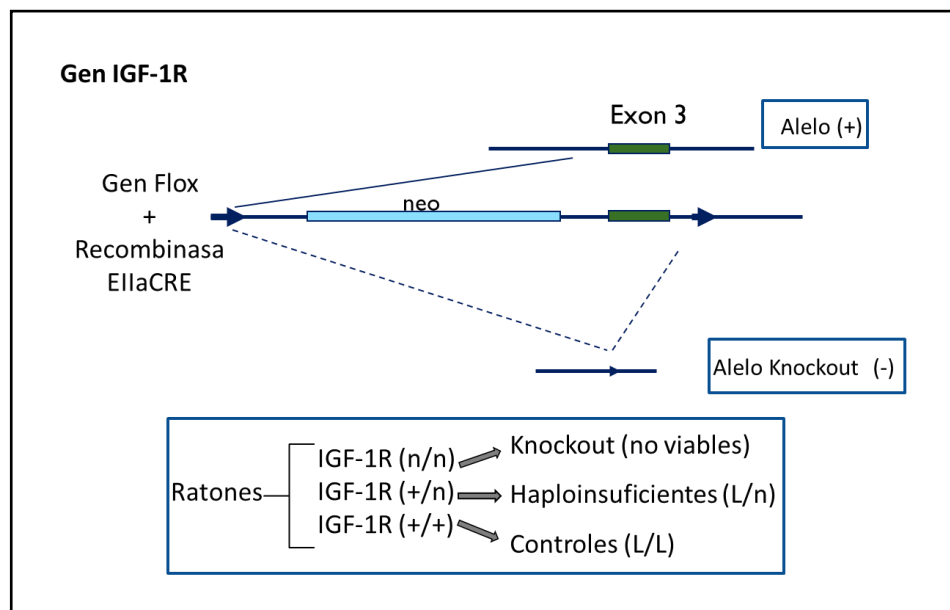
Diversos modelos animales confirman la importancia del sistema de IGFs en la iniciación, progresión y metástasis tumoral, especialmente en los modelos de ratones modificados genéticamente. Por ejemplo, en el modelo de ratón transgénico para adenocarcinoma de próstata (*TR*ansgenic Adenocarcinoma *M*ouse *P*rostate, TRAMP), la sobreexpresión selectiva del IGF-I humano en células epiteliales basales de próstata da como resultado la sobreexpresión del IGF-IR en estas células y el desarrollo espontáneo y gradual de cáncer de próstata (88). El modelo murino Bk5.IGF-1, con sobreexpresión del IGF-1 en las células de la capa basal de la epidermis genera hiperplasias permanentes que con la edad terminan generando tumores espontáneos (89). Otros modelos, como el ratón MTB.IGF-1R que tiene sobreexpresión del IGF-1R

en el epitelio mamario, muestran lesiones que progresan en el tiempo para terminar en adenocarcinomas, con un 25-30% de metástasis en pulmón (90).

Mediante la utilización de ratones transgénicos se han descrito también efectos directos de los IGFs sobre las células del endotelio vascular. Utilizando ratones con delección del exón 4 del gen del IGF-1R en las células endoteliales, ratones VENIFARKO, se observó una reducción significativa de la neovascularización de la retina inducida por oxígeno sugiriendo que el IGF-1 a través del IGF-1R, regula este proceso en la retina mediante la expresión de diferentes factores y/o proteínas involucradas en la vascularización (91).

En el laboratorio del Dr. Derek LeRoith se generaron ratones con deficiencia hepática de IGF-1 (ratones LID, *Liver-IGF-1 Deficient mice*), utilizando el sistema de recombinación cre-loxP y direccionando la expresión de la recombinasa Cre con el promotor de la albúmina, sintetizada exclusivamente en el hígado (92). Así, estos animales no expresan el ARN mensajero del *igf-1* en el hígado y tienen una reducción drástica -del 75%- en los niveles de IGF-1 circulante a pesar de lo cual, la expresión de IGF-1 en otros tejidos no se ve afectada y su crecimiento no difiere significativamente de aquellos ratones que no tienen esta deficiencia. Esto reafirma la importancia de la producción de IGF-1 extrahepática, paracrina/autocrina para la regulación del crecimiento (92). Por otro lado, este modelo ha permitido demostrar que los menores niveles de IGF-1 circulante disminuyen la incidencia de tumores de mama y piel además de una disminuir en el crecimiento y metástasis hepáticas de tumores de colon (93–95). A pesar de que la asociación entre niveles de IGF-1 e incidencia tumoral ha sido muy bien documentada en modelos animales, estos no permiten discernir entre el papel que tiene el IGF-1 en circulación versus el IGF-1 localmente producido en los tejidos. Para ayudar al entendimiento de este último interrogante se ha desarrollado un modelo murino de haploinsuficiencia del IGF-1R, que imitaría una deficiencia en los niveles de

IGF-1 producidos localmente. Este modelo descrito previamente (96) contiene secuencias LoxP flanqueando el exón 3 del gen del IGF-1R murino. La acción de la recombinasa EllaCre en etapas tempranas del desarrollo embrionario determina la generación de animales controles (L/L), con haploinsuficiencia (L/n) o con deficiencia completa de la expresión del gen de IGF-1R (n/n) (fig 7). Estos últimos, con ambos alelos del receptor recombinados (ratones n/n) no son viables. Los animales con haploinsuficiencia (L/n) tienen una disminución de un 50% de la expresión del IGF-1R en comparación con los ratones sin la modificación genética (L/L). El déficit funcional del sistema IGF-1/IGF-1R generado por la haploinsuficiencia del receptor tiene efectos mínimos durante la embriogénesis, pero se vuelve relevante en el crecimiento postnatal, por lo cual los ratones muestran un pequeño déficit en el crecimiento, reafirmando la importancia del sistema IGF-1/IGF-1R en esta etapa de desarrollo. Por otro lado, se encontró que en ratones macho la disminución en el número de receptores provoca un leve aumento en las concentraciones parciales de IGF-1 así como una disminución en la concentración de IGFBP-4. Este efecto no se observó en ratones hembra que parecen tener una mayor capacidad para tolerar la disminución en el número de receptores durante el crecimiento postnatal (97).



**Figura 7: Generación de los ratones transgénicos deficientes del IGF-1R.** El exón 3 del IGF-1R se flanqueó con cassette de resistencia a neomicina (neo) y 2 sitios loxP (triángulos). El exón 3 y el cassette de neo son eliminados por recombinación con la estrategia Cre-lox. En el recuadro se observan los genotipos obtenidos luego de la recombinación (Adaptado de Holzenberger, 2003, (96)).

## FEOCROMOCITOMA

El feocromocitoma (feo) es un tumor neuroendocrino que surge a partir de las células cromafines ubicadas en la médula de la glándula adrenal. Los paragangliomas (pgl) son tumores neuroendocrinos derivados del tejido cromafín extra-adrenal (sistema simpático ganglionar). Ambos se caracterizan por sintetizar, almacenar, metabolizar y secretar catecolaminas, aunque en los paragangliomas esta característica es menos frecuente. Una de sus manifestaciones clínicas es la amplia fluctuación en la presión sanguínea, que deriva en graves casos de hipertensión y arritmias (98). Según datos de Instituto Nacional del Cáncer de EEUU, este tumor tiene una incidencia que va de 2 a 8 por millón de personas por año (99) y se puede presentar en forma familiar o esporádica. En los casos de patologías familiares, el feocromocitoma se encuentra asociado al síndrome de neoplasia endocrina múltiple de tipo 2 (MEN2, con mutaciones en el gen *RET*), a la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL, con mutaciones en el gen

VHL) o a la neurofibromatosis de tipo 1 (NF1, con mutaciones en el gen *NF-1*). También se han encontrado mutaciones en los genes de la succinato-dehidrogenasa mitocondrial (SDH) en las subunidades B, C y D (100).

El feocromocitoma es un tumor que no sigue una progresión clásica, sino que puede adquirir capacidad metastásica en etapas tempranas de su desarrollo (101). Aunque la mayoría de los feocromocitomas son benignos, existe un porcentaje variable -entre el 5 y el 26%- de malignidad. No hay actualmente métodos histopatológicos confiables que permitan distinguir entre tumores benignos y malignos, siendo la presencia de metástasis en sitios distantes donde el tejido cromafín esta normalmente ausente el único indicador aceptado para definir malignidad (101). Los sitios de metástasis más comunes son los ganglios linfáticos, hueso, pulmón e hígado.

Los IGFs están involucrados en el crecimiento y tumorigénesis de la glándula adrenal. Los carcinomas adrenocorticales de alto grado de malignidad sobreexpresan el IGF-1R, mientras que la abundancia del IGF-1R en hiperplasias adrenocorticales y adenomas es similar a la del tejido adrenal normal (102,103).

Por otro lado, se ha demostrado la sobreexpresión del IGF-1R en tejidos de feocromocitoma (benigno) humano comparado con tejido adrenal normal (102). Por otro lado en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, encontramos una asociación entre los niveles de expresión del IGF-1R y la malignidad de feocromocitomas y paragangliomas (104) lo cual sugiere un posible papel para el circuito IGF-1/IGF-1R en la fisiopatología de la enfermedad.

Hasta el momento no se cuenta con líneas celulares humanas de feocromocitoma para el estudio de estos tumores, pero se han generado líneas celulares de feocromocitoma de ratón. Estas células derivan de tumores desarrollados en ratones heterocigotas para una mutación del gen de la neurofibromatosis o *Nf1* (105). Esta línea celular murina denominada MPC (*mouse pheochromocytoma cells*) expresa la enzima



feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT) necesaria para la síntesis de adrenalina, y además expresa niveles elevados de Ret, un receptor tirosina-quinasa característico de los feocromocitomas familiares y esporádicos en el humano (106). Por lo tanto, estas células son una herramienta potencial para el desarrollo de modelos experimentales de feocromocitoma y un modelo único para el estudio del fenotipo adrenérgico.

A diferencia de los tumores de mama y de colon, la utilización de modelos experimentales de ratón para el estudio del feocromocitoma maligno ha sido menos explorada. Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado la respuesta a IGF-1 de las células MPC en cultivo. Asimismo, ha desarrollado y caracterizado un modelo de feocromocitoma subcutáneo usando las células MPC en ratones normales de la cepa C57BL6 y en ratones LID (que tiene los niveles de IGF-1 circulante disminuidos). Nuestros resultados demuestran que el IGF-1 promueve el desarrollo del feocromocitoma murino a través del estímulo sobre la proliferación, la supervivencia sin anclaje, la formación de nuevos vasos y la inhibición de la apoptosis de las células MPC. *In vivo*, la deficiencia de IGF-1 circulante disminuye la incidencia y prolonga el período de latencia del feocromocitoma experimental (107).

Nuestros antecedentes demuestran que el IGF-1 **circulante** tiene un rol crítico en el mantenimiento del fenotipo tumoral, es por esto que en el presente trabajo nos interesamos en explorar el rol del circuito **local** de IGF-1/IGF-1R en relación con el microambiente del feocromocitoma experimental.

## TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son la segunda causa de cáncer en la infancia, superados únicamente por las leucemias, por lo que son los tumores sólidos más frecuentes en pediatría (108). Según el último informe del Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA, 2015) en nuestro país se diagnostican

anualmente un promedio de 245 tumores del SNC por cada millón de niños menores de 15 años (109). La clasificación más utilizada para los tumores del SNC es la “IV Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central de la Organización Mundial de la Salud (OMS)” del año 2007 (110) y su actualización 2016 (111). La misma clasifica los tumores según localización, tipo y grado histológico y se utiliza para predecir el comportamiento biológico de la neoplasia, lo cual aporta un valioso elemento al momento de decidir el tratamiento (112). De acuerdo al último informe del registro de tumores de SNC de los Estados Unidos la distribución de los mismos, por tipo histológico, muestra que en la población pediátrica los gliomas son los más representativos (40-50%) (108), seguidos por los meduloblastomas y los ependimomas (113).

Como para el resto de los tumores del SNC, existe una gradación de malignidad de la OMS que clasifica los gliomas en 4 grados. Sin embargo, en la práctica clínica se los divide en bajo grado (grados I y II) que representan aproximadamente el 85% de los casos, y alto grado (grados III y IV). Esto se debe a la marcada diferencia en la evolución y la respuesta al tratamiento de ambos grupos, con una media de supervivencia de más del 90% a 10 años en los niños con gliomas de bajo grado con resección quirúrgica completa y menor del 20% a cinco años en los pacientes pediátricos mayores de 3 años con gliomas de alto grado (114).

Al igual que en los niños, los gliomas son los tumores del SNC más frecuentes en los adultos, pero en ellos los glioblastomas representan el 60% de los casos, siendo el resto gliomas de bajo grado. Otra diferencia entre ambos grupos etarios es que en los adultos los gliomas de bajo grado tienen la capacidad de malignizarse en un alto porcentaje (60- 70%).

Dentro de los gliomas infantiles el más frecuente es el astrocitoma pilocítico (grado I) que representa el 70% de los mismos. Su localización más frecuente es en cerebelo,

donde se puede lograr la resección tumoral completa en un 94% de los casos. Otras localizaciones comunes pueden ser los nervios ópticos, el hipotálamo y el tronco, donde la resección completa es mucho más difícil por las estructuras nobles que los rodean y se logra solo en un 3,2% de los casos. Los gliomas de alto grado, o glioblastomas, representan aproximadamente el 20% de los tumores gliales en edad pediátrica y en su gran mayoría surgen de *novo*.

La caracterización molecular de los gliomas de adultos ya ha sido ampliamente estudiada (115). Sin embargo, dadas las diferencias mencionadas entre los gliomas de niños y adultos, en los últimos años la caracterización biológico-molecular de estos tumores en edad pediátrica ha cobrado gran relevancia. Dado el avance de las medidas terapéuticas en la oncología pediátrica, el problema actual radica en las secuelas neurológicas de las mismas, especialmente en niños de corta edad, por lo cual resulta imperativo encontrar marcadores moleculares pronósticos que permitan subclasificar los pacientes dentro de cada diagnóstico con el objetivo de determinar subgrupos de riesgo, lo que ha permitido en algunos casos, disminuir las dosis de radioterapia minimizando secuelas posteriores (116). En los gliomas de bajo grado en edad pediátrica, a excepción de los que nacen en los nervios ópticos, el tratamiento en primer término es la cirugía. En caso de permanecer un remanente tumoral se espera la evolución del mismo antes de definir un tratamiento adyuvante. Actualmente, el tratamiento quimioterápico convencional de pacientes con gliomas de bajo grado progresivos se realiza con vinblastina (117). Por lo tanto, la búsqueda de distintos marcadores de agresividad específica que pudieran ser establecidos como factores pronósticos beneficiarían a los pacientes con tumores progresivos, pudiendo iniciar el tratamiento adyuvante inmediatamente después de la cirugía.

Se ha establecido en estudios previos que los gliomas utilizan varias estrategias metabólicas, dentro de las cuales se encuentran las vías catabólicas, utilizadas para la

producción de energía y a su vez las vías anabólicas para poder sustentar el crecimiento celular. Dentro de estas vías se incluyen la glucólisis aeróbica, que aporta no solo energía, sino que provee los esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos nucleicos mediante la vía de las pentosas fosfato. También encontramos el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que es central para el metabolismo de los aminoácidos y la producción de acetil-CoA. Por último, se puede mencionar el metabolismo de los ácidos grasos, que contribuye significativamente a la producción de energía en este tipo celular, así como a la formación de membranas lipídicas (118).

En cuanto al sistema de los IGFs, se sabe que el IGF-1R está implicado tanto en el crecimiento postnatal como en el desarrollo tumoral del sistema nervioso central (119). Ya en el año 1997 Glick y colaboradores evidenciaron la presencia tanto del receptor de insulina (IR) como del IGF-1R en muestras de tumores humanos de SNC (120). La sobreexpresión del IGF-1R como de sus ligandos IGF-1 e IGF-2 ha sido detectada en astrocitomas humanos y la activación del sistema indica que el mismo contribuye a la progresión tumoral (121,122).

Sin embargo, la expresión de los componentes del sistema de los IGFs en astrocitomas humanos de alto grado (glioblastomas) se ha reportado mayoritariamente en series pequeñas y con muestras de pacientes adultos, sin llegar a resultados consistentes. En estos estudios, se ha encontrado expresión de IGF-1 en la mayoría de los glioblastomas utilizando hibridación in situ (100%) o IHQ (75-100%), mientras que la expresión del IGF-2 fue siempre menos prevalente (123–125). Suvasini y colaboradores han reportado que los niveles de transcritos de IGF-1 e IGF-2 evaluados por PCR en tiempo real no varían entre astrocitomas, glioblastomas y muestras de tejido cerebral normal en muestras de pacientes adultos (126). En este estudio tampoco se encontraron diferencias en la expresión del IGF-1R entre los grupos comparados.

Algunos estudios han reportado el valor pronóstico del sistema de los IGFs en la patogénesis del glioblastoma en pacientes adultos. Por un lado, se ha identificado un grupo de glioblastomas caracterizado por la sobreexpresión del IGF-2 que pertenece a una subclase asociada con peor sobrevida (127). En segundo lugar, otro estudio ha demostrado una correlación inversa entre los niveles de expresión del IGF-1R a nivel de mensajero y proteínas y la sobrevida de los pacientes (128).

Recientemente Maris y colaboradores han detectado que la expresión de IGF-1R y el IGF-2R es significativamente mayor en muestras de glioblastoma que en tejido cerebral normal (129). En este estudio realizado por IHQ en 167 casos de pacientes adultos, dividen los tumores en tres grupos: sin marca, con marca débil o marca fuerte y encuentran una asociación negativa entre la expresión del IGF-1R y la sobrevida de los pacientes con glioblastoma por lo que proponen al IGF-1R como marcador pronóstico. Asimismo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, en pacientes pediátricos, la presencia del IGF-1R en el núcleo de las células tumorales está relacionado con tumores de mayor grado y un peor pronóstico para estos pacientes (130).

Por otro lado, se ha demostrado la presencia del IGF-1R en líneas celulares de glioblastoma (131,132). In vitro se ha observado un aumento de la proliferación, sobrevida y migración de estas células en respuesta a los IGFs (127,131–134). Considerando estos antecedentes, para la realización del presente trabajo se utilizó la línea celular U-87 MG, generada a partir de un glioblastoma de grado IV. Estas células presentan una mutación inactivante en la enzima PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) la cual genera que no se contrarreste el aumento en los niveles de PIP3 generados por PI3K (135). Adicionalmente, esta línea celular expresa de manera nativa (sin mutaciones) la enzima IDH (isocitrato deshidrogenasa), la cual se encuentra mutada en la mayoría de los gliomas adultos, pero no presenta mutaciones en los glioblastomas pediátricos (136).

Estudios previos han demostrado que la expresión por infección viral de un IGF-1R con su porción tirosina quinasa defectuosa suprime el crecimiento y genera apoptosis en esta línea celular, de la misma manera que lo hace la reintroducción de la proteína PTEN nativa (137). Por otro lado, Zamykal y colaboradores han generado un modelo de glioblastoma intracerebral en ratones mediante la inyección de células U-87 MG. Los autores reportan que el uso del anticuerpo bloqueante del IGF-1R IMC-A12 inhibe el crecimiento tumoral (128). Tomados en conjunto, los antecedentes mencionados las células U-87 MG son un modelo adecuado para el estudio de la expresión y localización de los componentes del sistema de los IGFs en gliomas de pacientes pediátricos.

# *Objetivos*

---

## **MARCO DE REFERENCIA**

El sistema de los IGFs, por sus características mitogénicas y antiapoptóticas, está implicado en el desarrollo del cáncer. Si bien el feocromocitoma es un tumor poco frecuente en su forma esporádica, su incidencia está asociada hasta en un 40% a enfermedades hereditarias que involucran mutaciones en diversos genes, como *VHL*, *RET*, *SDHB*, *SDHD*, *NF1* entre otros. Nuestro instituto, el Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) es un centro de referencia para el diagnóstico del feocromocitoma/paraganglioma al que se derivan pacientes de diversas instituciones públicas y privadas del país. Como se mencionó en la introducción, los feocromocitomas y paragangliomas son malignos en un 5-25%. Previamente, hemos demostrado la sobreexpresión del IGF-1R en feocromocitomas malignos y su valor pronóstico para la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad, así como de manera experimental mediante un modelo murino y cultivos celulares, que el IGF-1 modifica el fenotipo de células de feocromocitoma, siendo muy importante como factor de supervivencia celular. Dado que la interacción de las células tumorales con su entorno es de vital importancia para el establecimiento y crecimiento de un tumor en un sitio distante al tumor primario, con la realización del presente trabajo de tesis esperamos aportar conocimientos relacionados con la regulación por parte del IGF-1 de las primeras interacciones responsables del establecimiento de células de feocromocitoma, es decir, células transformadas, en un microambiente modificado genéticamente. La utilización y generación de modelos experimentales adecuados para el estudio del feocromocitoma y de los mecanismos involucrados en las distintas etapas del establecimiento tumoral, es de vital importancia. Con el desarrollo de este objetivo esperamos generar beneficios para toda la comunidad científica de la especialidad, tanto en el ámbito de las ciencias médicas básicas como aplicadas.



---

Por otro lado, como se mencionó, los tumores de SNC son los tumores sólidos de mayor frecuencia en pediatría. En nuestro grupo de investigación se está realizando un trabajo prospectivo de estudio de dicho sistema en muestras de tumores del SNC de pacientes pediátricos que ya lleva incluidos más de 100 pacientes. Por inmunohistoquímica, hemos encontrado que todos los tumores expresan el IGF-1R y que en gliomas (el subgrupo tumoral más frecuente) la localización nuclear del receptor IGF-1R se asocia a una menor supervivencia de estos pacientes. Como segundo objetivo de este plan de tesis, nos propusimos determinar los niveles de expresión de los componentes principales del sistema de los IGFs en los gliomas, y mediante el trabajo experimental, tanto in vitro como in vivo avanzar en el conocimiento de algunos de los mecanismos subyacentes en el comportamiento diferencial de los gliomas estudiados.

El avance en el conocimiento de los tumores de SNC, así como en la definición de grupos de pacientes que posibilita el tratamiento según la biología del tumor y su potencial respuesta significa definir una terapia dirigida con mayor exactitud. En particular, en pediatría la identificación de marcadores que ayuden a individualizar tratamientos efectivos y específicos cobra especial importancia porque evita secuelas innecesarias en un cerebro en desarrollo.

---

## **HIPÓTESIS**

En base a los antecedentes presentados, nuestra *hipótesis de trabajo* es que el sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina tiene un papel en el desarrollo tumoral tanto a nivel del establecimiento inicial del tumor como en su crecimiento y progresión. Así, el ***circuito local IGF-1/IGF-1R*** presente ***en las células que constituyen el microambiente del tumor*** (por ejemplo, fibroblastos, células endoteliales y/o células ubicadas en la vecindad del tumor) tiene un papel en el mantenimiento de dicho microambiente, y por lo tanto un desbalance en el mismo tendrá un impacto sobre procesos como el establecimiento tumoral, la neovascularización y la diseminación de las células tumorales hacia sitios secundarios. Para estudiar este fenómeno, utilizaremos un modelo experimental de feocromocitoma, con ***haploinsuficiencia del IGF-1R en células no tumorales***. Por otro lado, ***el sistema de los IGFs (ligandos y receptores) presente en las células tumorales*** afecta su proliferación y supervivencia, determinando el comportamiento y características tumorales. Para el estudio de este aspecto del sistema de los IGFs, utilizaremos ***muestras de tumores pediátricos de SNC y líneas tumorales humanas de glioblastoma con expresión diferencial de algunos componentes del sistema de los IGFs***.

Para poner a prueba estas **dos hipótesis**, se plantearon **dos objetivos específicos**, con diseños y modelos adecuados para cada una de ellas. El desarrollo de los objetivos planteados dio origen a los **dos capítulos** que componen este trabajo de Tesis Doctoral.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es caracterizar el papel del sistema de los IGFs en diferentes etapas del proceso tumoral en dos modelos con importancia en pediatría. El objetivo a largo plazo es aportar al entendimiento del complejo sistema de los IGFs y su papel en el control de los mecanismos involucrados en el establecimiento, desarrollo y progresión tumoral, contribuyendo de esta manera al diseño de mejores herramientas terapéuticas.

Los objetivos específicos constituyen diferentes enfoques dirigidos a contestar ambos aspectos de nuestra hipótesis e involucran dos modelos de cáncer relevantes en pediatría por lo cual constituyen dos capítulos independientes, y están definidos según el modelo de estudio.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

**Objetivo específico 1-** *Dilucidar el mecanismo por el cual el sistema de los IGFs presente en células no tumorales participa en el establecimiento tumoral en un modelo de feocromocitoma murino.*

Utilizaremos un modelo de haploinsuficiencia del IGF-1R, en el cual pondremos de manifiesto el impacto del circuito IGF-1/IGF-1R presente en las células que constituyen el microambiente tumoral en los estadios tempranos del establecimiento, el crecimiento y características del feocromocitoma murino, tanto *in vivo* como *in vitro*.

El desarrollo de este objetivo constituirá el capítulo 1.

**Objetivo específico 2-** *Caracterizar la expresión y el impacto de componentes del sistema de los IGFs en tumores de sistema nervioso central de pacientes pediátricos y su vinculación con los diferentes grados de malignidad.*

Nos proponemos:

**2 a.-** determinar los niveles de expresión de *IGF-1*, *IGF-2*, *IGF-1R* e *IR* en muestras de tumores del sistema nervioso central de población pediátrica.

**2 b.-** evaluar el impacto de la sobreexpresión y/o localización subcelular del IGF-1R en el fenotipo *in vitro* e *in vivo* en una línea de glioblastoma humano (U-87 MG)

El desarrollo de este objetivo constituirá el capítulo 2.

# *Capítulo 1*

## OBJETIVO ESPECÍFICO 1

*Dilucidar el mecanismo por el cual el sistema de los IGFs participa en el establecimiento tumoral en un modelo de feocromocitoma murino.*

Para la realización de este objetivo se utilizó un modelo de haploinsuficiencia del IGF-1R, en el cual se pone de manifiesto el impacto del circuito IGF-1/IGF-1R presente en las células que constituyen el microambiente tumoral en los estadios tempranos del establecimiento, el crecimiento y características del feocromocitoma murino, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Para evaluar el circuito local IGF-1/IGF-1R en el establecimiento, crecimiento y características del feocromocitoma experimental *in vivo* se inyectaron ratones con células MPC. Se utilizaron animales macho modificados genéticamente, haploinsuficientes para el IGF-1R en todas sus células (ratones *Igf-1r<sup>fl/n</sup>*, fenotipo alelo nulo del IGF-1R o L/n) y ratones con expresión normal del IGF-1R (ratones *Igf-1r<sup>fl/fl</sup>*, fenotipo control, L/L).

Para realizar una mejor caracterización de lo observado en los experimentos *in vivo*, se llevaron a cabo estudios *in vitro* que permitieron, utilizando un sistema aislado, poner de manifiesto las diferencias esperadas. Para cumplir con este objetivo se prepararon cultivos primarios de fibroblastos de la dermis de los ratones control y haploinsuficientes para IGF-1R, que se utilizaron en distintos tipos de ensayos.

# *Materiales y Métodos*

Línea celular de feocromocitoma

Como modelo de feocromocitoma se utilizó la línea celular MPC (MPC4/30PRR) (Mouse Pheocromocytoma Cells), gentilmente cedida por el Doctor A. Tischler (Universidad Tufts, Boston). Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % suero equino (HS), 5 % suero fetal bovino (SFB) y mantenidas en estufa gaseada con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Modelo animal de feocromocitomaAnimales:

Se utilizaron ratones modificados genéticamente haploinsuficientes para el IGF-1R en todas sus células, descritos previamente por Holzenberger y colaboradores (96). Estos ratones, con fondo genético correspondiente a la cepa C57BL/6, poseen sitio de recombinación para la recombinasa embrionaria EllaCre en ambos alelos del gen del IGF-1R. A partir de su endocría se obtienen ratones con recombinación en uno de los alelos, haploinsuficientes para el IGF-1R (*Igf-1r*<sup>fl/n</sup> o L/n) y ratones sin recombinación, con expresión normal del IGF-1R (*Igf-1r*<sup>fl/fl</sup> o L/L).

<b><u>Nombre</u></b>	<b><u>Fenotipo</u></b>	<b><u>IGF-1R tisular</u></b>
<b><i>Igf-1r</i><sup>fl/fl</sup> ó L/L</b>	Control	100%
<b><i>Igf-1r</i><sup>fl/n</sup> ó L/n</b>	alelo nulo para el IGF-1R haploinsuficiencia del IGF-1R	50%

**Tabla 1: cohorte de ratones transgénicos utilizados.**

Los ratones fueron mantenidos según la guía del cuidado y uso de animales experimentales (138) recibiendo agua y comida *ad libitum* en un régimen de luz-oscuridad de 12 h.



**Genotipificación:**

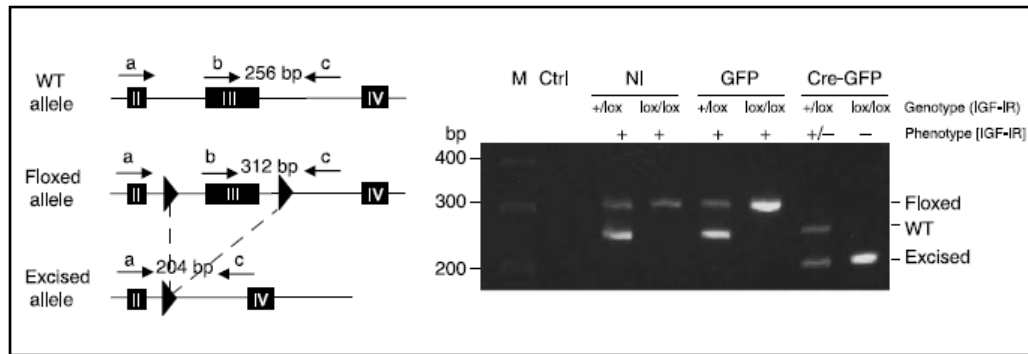
La genotipificación se realizó utilizando ADN extraído de tejido de biopsias de las colas de ratones de 3-4 semanas de edad que se procesaron según ha sido descrito previamente (92). Brevemente, el material obtenido fue incubado por 12 h con agitación a 55 °C en buffer de lisis y proteinasa k (20 mg/ml). Luego de la incubación se centrifugaron las muestras para quitar los restos no lisados, se tomó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 500 µl de isopropanol. Se centrifugó para obtener el ADN y el mismo se lavó con 1 ml de etanol 70 %. Finalmente, el ADN fue resuspendido en agua destilada para su posterior análisis.

Se empleó la metodología de PCR en tiempo final utilizando cebadores que permitieron identificar simultáneamente el alelo del receptor recombinado (nulo) y el alelo sin recombinación (139). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 4 minutos a 94°C, luego 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62,5 °C por 45 segundos y 72 °C por 50 segundos. Para finalizar un último ciclo de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa 1,5 % y teñidos con bromuro de etidio para verificar la presencia de los fragmentos de interés.

Primer	Dirección	Secuencia
A	Forward	5 CCATGGGTGTTAAATGTTAATGGC 3
B	Reverse	5 ATCTTGGAGTGGTGGGTCTGTTTC 3
C	Reverse	5 ATGAATGCTGGTGAGGGTTGTCTT 3

**Tabla 2:** Cebadores utilizados para la genotipificación de los ratones transgénicos utilizados.



**Figura 8:** Esquema de la localización de los sitios *loxP* flanqueado el exon III del gen del IGF-1R reconocidos por la recombinasa embrionaria *EllaCre*. Las bandas esperadas con de 204 pb para el alelo recombinado (alelo nulo) y 312 pb para el alelo flanqueado por la secuencia *loxP*, sin recombinar. (Adaptado de Froment y colaboradores (139)).

#### Modelo de feocromocitoma:

Para generar el modelo tumoral se inyectaron  $1 \times 10^6$  células MPC en el flanco derecho de ambos grupos de ratones de 6-8 semanas de edad. Se realizaron monitoreos semanalmente y se registró la incidencia y período de latencia tumorales. Los diámetros mayor y menor de los tumores fueron medidos con calibre para realizar el cálculo de su volumen (140).

$$\frac{1}{2} \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$$

Los ratones fueron sacrificados de 8 a 10 semanas post-inóculo o cuando el tumor alcanzó un diámetro mayor de 2 cm. Al momento del sacrificio los ratones fueron inyectados con una solución de bromodesoxiuridina, para calcular el índice de proliferación tumoral.

Los tumores fueron disecados y una porción procesada para histología y otra congelada para extracción de ARN y proteínas a fin de estudiar los perfiles genéticos y de expresión relacionados con el fenotipo tumoral observado.

Por otro lado, se tomaron muestras de piel post mortem de la región dorsal de ambos grupos de ratones que también fueron procesadas para su estudio histológico.

#### Cálculo de tamaño muestral:

El tamaño muestral se calculó considerando que este es un estudio de contraste de hipótesis, donde se comparan principalmente dos proporciones (incidencias tumorales). Se tomó un nivel de confianza o seguridad del 95 % (alfa de 0.05), un poder estadístico del 80 % (beta de 0.20) para una hipótesis unilateral (la incidencia en el grupo L/n será menor que el 100 % del grupo L/LI). De nuestros datos preliminares sabíamos que la incidencia o proporción de ratones que desarrollan tumores en los controles es del 100 %, mientras que en el grupo L/n es de aproximadamente 85 %. Asumiendo un comportamiento similar, y estimando un 20 % de pérdida, se calculó que se necesitarían 44 ratones por grupo experimental.

#### Procesamiento histológico

Los tumores disecados y las biopsias de piel fueron fijados en una solución de formaldehído al 4 % por 24 h, embebidos en parafina, cortados con micrótopo en secciones de 5  $\mu$ m y montadas sobre portaobjetos. Los cortes fueron rehidratados con soluciones de etanol de graduación decreciente y colocados en agua destilada como última instancia para la realización de las diferentes coloraciones o para inmunomarcación.

Se realizaron tinciones topográficas de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson para evaluar la integridad y características generales de los tejidos. Luego de las coloraciones los cortes fueron observados en microscopio óptico Nikon Eclipse 50i con aumento 40x para su análisis.

#### Estudio por inmunohistoquímica (IHQ):

Los cortes de tumores realizados para IHQ fueron montados sobre portaobjetos con carga. Los mismos fueron hidratados y se les realizaron 5 ciclos de recuperación antigénica calentando en buffer citrato (pH 6) en microondas por 80 segundos. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con agua oxigenada de 10 volúmenes

por 30 minutos y el bloqueo de sitios inespecíficos con suero de caballo 5 % en PBS por otros 30 minutos.

Se realizó la incubación con el anticuerpo primario correspondiente para cada técnica (ver detalle a continuación) toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Para revelar se utilizó el sistema de detección LSAB + Sistema de HRP, DAB líquida + sustrato cromógeno siguiendo las instrucciones del fabricante y se coloreó con hematoxilina para evidenciar los núcleos. Una vez finalizada la técnica, los preparados se deshidrataron con soluciones de etanol de graduación creciente y se colocaron en xilol para luego ser montados en resina natural.

1) Evaluación de la expresión del IGF-1R: se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce la subunidad  $\beta$  de IGF-1R en dilución 1/500 (#3027, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA). Se estudió su presencia, intensidad de marcado y localización, luego de la contracoloración con hematoxilina.

2) Evaluación de la proliferación celular: se detectó la marcación positiva para BrdU con un anticuerpo monoclonal en dilución 1/100 (Dako, Carpinteria, CA, USA) como ha sido descrito previamente (107). Se realizó un análisis cuantitativo de los cortes, contando por lo menos 3000 núcleos por preparado. Muestras de intestino delgado de los ratones fueron usadas como control de eficiencia de la incorporación de BrdU.

3) Evaluación de la vascularización tumoral: Se realizó inmunohistoquímica en los cortes de tumores utilizando un anticuerpo policlonal específico para el Factor de Von Willebrand (FVIII, dilución 1/400, Dako, Carpinteria, CA, USA), como marcador de neovascularización, y posterior contracoloración con hematoxilina. Se identificaron las áreas de alta densidad de marcado para FVIII, considerando como vaso todas las zonas de lumen delimitadas por células positivas, grupos de células o células individuales también positivas, excluyendo células redondas o poliédricas que podrían representar

eritrocitos, macrófagos o cualquier otra célula del plasma (141). Se evaluaron al menos 20 campos por corte con un aumento de 20x.

Para el estudio de la densidad vascular, el tamaño muestral se calculó considerando que este es un estudio de contraste de hipótesis, donde se comparan principalmente las medias de dos poblaciones. En un estudio piloto usando tumores control (6 cortes por tumor), determinamos por inmunohistoquímica para Factor VIII que la cantidad de vasos por campo de 20X es alrededor de  $63 \pm 18$ . Para el cálculo del tamaño muestral en este estudio consideramos que una diferencia entre las medias de 20 vasos/células aisladas por campo sería una diferencia relevante (aproximadamente el 30 % de diferencia). Con un nivel de confianza o seguridad del 95 % (alfa de 0.05), un poder estadístico del 80 % (beta de 0.20) para una hipótesis bilateral, una diferencia entre las medias de aproximadamente 20 células/vasos por campo el tamaño de la muestra es de 10 ratones por grupo experimental, considerando 6 cortes por tumor. Estimando un 20 % de pérdida, el tamaño muestral por grupo experimental es de 12 ratones por punto a evaluar.

### Cultivos Primarios

Se realizaron cultivos primarios a partir de la piel de la región dorso-lateral de ratones de la cepa C57BL6, haploinsuficientes para el IGF-1R (ratones L/n) o control (L/L) utilizando el protocolo descrito por Takashima y colaboradores (142). Brevemente, antes de tomar la muestra de piel se aplicó etanol 70 % y se rasuró la piel de los ratones para eliminar el pelo. Se lavaron las muestras de piel con PBS y se removió el tejido subcutáneo con pinzas. Luego se cortó la piel en tiras para ser incubadas con tripsina por 30 min en estufa a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Las muestras se lavaron con PBS y se cortaron en cuadrados chicos (2-3 mm) que se colocaron de a 5-10 en placa de cultivo de 6 pocillos o 2 a 3 cuadrados en placa de cultivo de 24 pocillos. Luego se cubrieron con cubreobjetos estériles y se incubaron con medio RPMI (10 % suero

equino, 5% suero fetal bovino) en placas de cultivo estufa a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> hasta que los fibroblastos de la dermis migraron y cubrieron un 80 % de la superficie de las placas.

1) Obtención de medios condicionados: los cultivos primarios de fibroblastos fueron incubados con medio RPMI suplementado con 2,5 % de suero equino y 1,25 % suero fetal bovino. Luego de 24 h se recogió el medio, se centrifugó y almacenó para ser utilizado en posteriores experimentos de proliferación y muerte celular.

2) Obtención de matrices diferenciales: los cultivos primarios de fibroblastos fueron irradiados en microondas con 2 pulsos de 2 min a 650W, separados por 1 minuto de espera para detener la proliferación de los fibroblastos y conservar el estroma generado por los mismos, como ha sido descrito previamente (143). Las placas se lavaron con PBS y fueron utilizadas para los experimentos de proliferación y muerte celular como se describe más adelante.

#### *Ensayos de proliferación celular con medios condicionados:*

Una vez obtenidos los medios condicionados los mismos se utilizaron para cultivar las células MPC en ensayos de proliferación. Se sembraron  $4 \times 10^5$  células MPC por pocillo en placas de 24 pocillos con medio RPMI completo por 24 h. Se consideró una placa por cada punto (día) del ensayo, y por cada condición evaluada: medio condicionado por fibroblastos de ratones control (L/L) o por fibroblastos de ratones haploinsuficientes (L/n). Cada punto se realizó por triplicado y además se utilizó una placa adicional para determinar el número inicial de células MPC. Pasadas las 24 h del sembrado de las MPC se cambió el medio completo por medio fresco condicionado por los fibroblastos de ratones control (L/L) o haploinsuficientes (L/n). Estos medios condicionados se cambiaron cada 48 h. Luego de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo con los medios condicionados, las células MPC se trataron con tripsina (0,25 %) y se realizó una coloración de exclusión con azul tripan 0.5 % para contar en cámara de Neubauer el número de células viables en cada punto y condición.

Ensayos de proliferación celular en matriz diferencial:

Se midió la proliferación de las células tumorales MPC cultivadas sobre matrices diferenciales generada por los fibroblastos antes descriptas. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células MPC por pocillo y se incubaron con medio RPMI completo (10 % suero equino, 5 % suero fetal bovino). Se consideró una placa por cada punto (día) de ensayo y por cada condición evaluada: matriz diferencial generada por fibroblastos de ratones control (L/L) o haploinsuficientes (L/n). Cada punto se realizó por triplicado y además se utilizó una placa adicional para determinar el número inicial de células MPC. Luego de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo en las distintas matrices, las células MPC se trataron con tripsina (0,25 %) y se realizó una coloración de exclusión con azul tripan 0.5 % para contar en cámara de Neubauer el número de células viables en cada punto y condición.

Proliferación celular por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) in vitro

En el día 5 de cultivo de las células MPC sobre matriz diferencial el medio de cultivo fue reemplazado por 400uL medio fresco con el agregado de 40  $\mu$ L de bromodesoxiuridina (1mg/ml concentración final), se incubaron las células por 30 minutos y se fijaron con metanol: acético (3:1) por 30 min para inmunocitoquímica. El ADN fue desnaturalizado mediante incubación con 70 % etanol-NaOH 0,2M seguido por etanol 70 % y 96 % frío. Por último, se utilizó una dilución 1/400 del anticuerpo monoclonal anti-BrdU y se incubó en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche, previo bloqueo de la peroxidasa endógena y sitios inespecíficos. Se reveló utilizando el sistema de detección LSAB + Sistema de HRP, DAB líquida + sustrato cromógeno (Dako, Carpinteria, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para incorporación de BrdU (núcleo marcado) respecto del total de células contadas. Se contaron al menos 4000 células por condición.

### Muerte celular

Las células fueron incubadas con medios condicionados o sobre matrices diferenciales generadas por fibroblastos de ratones control (L/L) o haploinsuficientes (L/n) durante 1 o 5 días. Se evaluó la apoptosis de las mismas utilizando la técnica de tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio como ha sido descrito previamente (144). Las células cultivadas en las distintas condiciones fueron tripsinizadas, resuspendidas en PBS e incubadas con una solución de naranja de acridina (100 µg/ml) y bromuro de etidio (100 µg/ml). Las células fueron evaluadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss AxioScope A1) y clasificadas como vivas, apoptóticas o necróticas. Se contaron al menos 300 células por condición y se calculó el porcentaje de apoptosis como la relación entre las células clasificadas como apoptóticas respecto del total de células contadas.

### Evaluación de la expresión proteica

Extracción de proteínas:

1) Proteínas totales: Las células fueron lisadas utilizando buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche Diagnostics, IN. USA) como ha sido descrito previamente (145). Brevemente, los lisados se centrifugaron a 12.000 xg por 20 min a 4 °C.

2) Integridad del colágeno luego de irradiación en microondas: Para la obtención del componente acelular luego de la irradiación del cultivo primario de fibroblastos, los pocillos de las placas fueron lavados con PBS y agua destilada y luego se incubó con una solución de SDS 0.2 % durante 30 min a 37 °C con agitación con fines extractivos. Una vez obtenida la fracción proteica por alguna de las técnicas descriptas anteriormente, la concentración proteica fue determinada utilizando el reactivo de Bradford (BIO-RAD Laboratories, Philadelphia, PA, USA).



La evaluación de la expresión proteica se llevó a cabo utilizando la técnica de Western Blot. Las proteínas (20-75 µg) se separaron por SDS-PAGE (10 % acrilamida) y fueron transferidas a membranas de PVDF. Estas membranas fueron bloqueadas con soluciones de alto contenido proteico (leche o BSA) durante 2 h, incubadas con anticuerpos primarios de interés durante la noche a 4 °C y reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial ECL Prime (Amersham, GE Healthcare, UK).

Los anticuerpos utilizados en este capítulo fueron los siguientes: anti IGF-1R β (#3027), anti- caspasa 3 clivada (#9661) y anti-β actina (#4970) de Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Anticuerpos anti IGFBP2 (SC-718) de Millipore (Darmstadt, Alemania), anti- fibronectina (SC-8422) y anti-colágeno tipo I (SC-59772) de Santa Cruz Inc (Dallas, TX, USA).

#### Evaluación de la expresión génica

Extracción de ARN: las muestras a extraer fueron homogeneizadas en Trizol y a continuación el ARN fue extraído utilizando un kit comercial (DirectZol, ZymoResearch, Irvine, CA). La concentración del ARN y su pureza fue determinada utilizando NanoDrop, registrando su concentración y la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (260/280).

Retrotranscripción: A partir de 1 µg de ARN se llevaron a cabo las retrotranscripciones (RT-PCR), utilizando *Random hexamers* y la enzima SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ADNc resultante se diluyó 1/10 para ser utilizado para los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real.

Cuantificación relativa de la expresión génica: esta se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando la enzima comercial KapaSybrFast (KapaBiosystems, Boston, MA, USA) en un termociclador StepOne Plus (Life Technologies). Brevemente,

en un volumen final de 10  $\mu$ l se colocaron 7  $\mu$ l de la mezcla comercial y 3  $\mu$ l de la dilución del ADN copia (ADNc) de cada muestra a analizar. Se realizó una curva de calibración para cada gen utilizando diluciones de una mezcla de partes iguales de ADNc de todas las muestras. Mediante el método de  $\Delta\Delta C_t$  se calcularon las concentraciones relativas de cada gen respecto a la expresión de HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) utilizada como gen de referencia (146). Los valores se presentan como veces de cambio (*fold change*) en relación a las condiciones control, detalladas en cada caso. Los genes evaluados fueron IGF-1R, TGB $\beta$ , IGF-1, colágeno tipo I (Col I), elastina (ELN), periostina (POSTN), tenascina (TNC), fibronectina (FN) e integrinas (Itg)  $\alpha$ V,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3, las secuencias de los cebadores y sus concentraciones usadas se muestran en la tabla suplementaria 1.

Las condiciones de ciclado fueron estándar: 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Luego del ciclado en todos los casos se realizó una curva de disociación (*melting*) del producto de PCR para verificar la formación de un único producto. Esta curva se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo de 15 segundos a 95 °C, 1 ciclo de 1 minuto a 60 °C y luego se aumentó la temperatura de a 0,3 °C hasta llegar a 95°C.

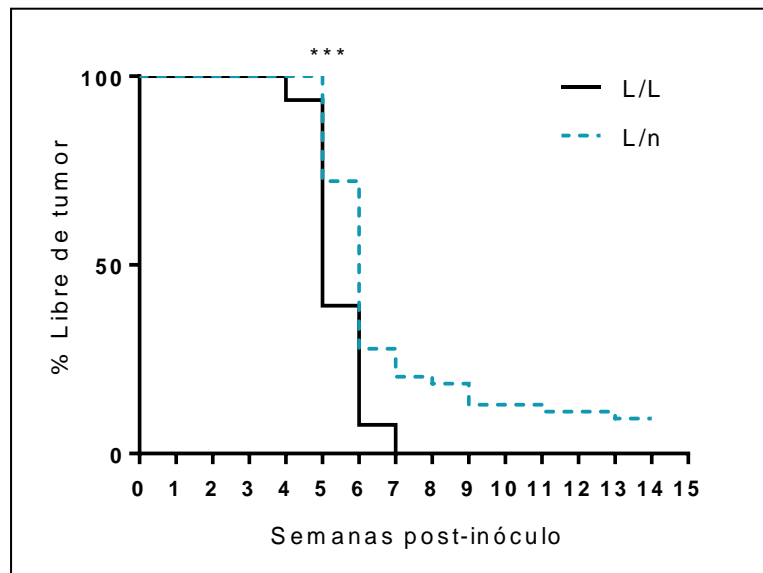
# *Resultados*

## **Estudios in vivo**

Para estudiar los efectos de la deficiencia local del circuito IGF-1/IGF-1R utilizamos un modelo murino de feocromocitoma caracterizado previamente por nuestro grupo de investigación (107). Se inyectaron células MPC por vía subcutánea para la generación de tumores en ratones macho haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n) y en ratones control (L/L).

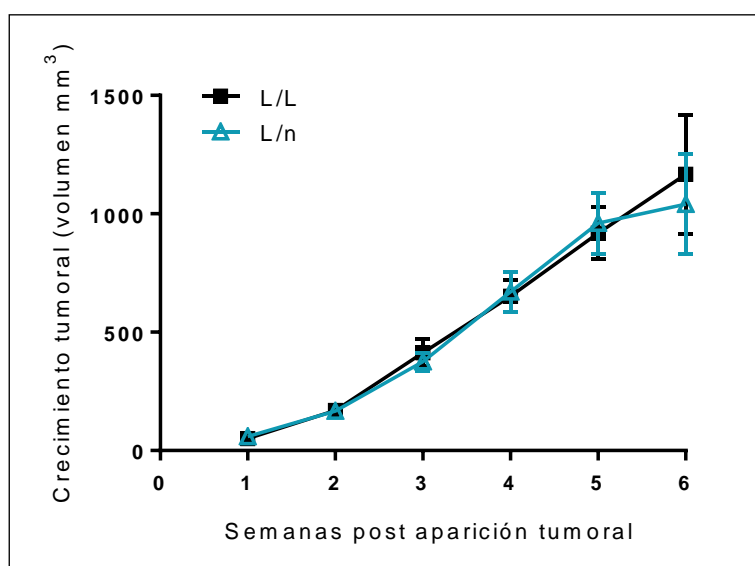
### **La deficiencia local del IGF-1R modifica la incidencia tumoral**

Mediante la confección de curvas de Kaplan-Meier se analizaron la incidencia y el período de latencia para la aparición de tumores en un total de 125 ratones inoculados (77 L/L y 48 L/n). Como se puede observar en la figura 9, el 100 % de los ratones del grupo control desarrollaron tumor mientras que 5 de los 48 L/n inyectados permanecieron libre de tumor aún en la semana 13 post-inóculo. Asimismo, el período de latencia hasta la aparición de tumores palpables en un 50 % del grupo experimental, fue significativamente más corto para los ratones L/L que para los L/n (5 vs 6 semanas).



**Figura 9: La deficiencia local del circuito IGF-1/IGF-1R modifica la incidencia y prolonga el periodo de latencia del feocromocitoma experimental. Las curvas se realizaron considerando la semana de aparición de un tumor palpable (L/L vs L/n. \*\*\* $p < 0.0001$ , Prueba de Log-Rank).**

Una vez que los tumores fueron evidentes a la palpación, se comenzó con el registro de los volúmenes tumorales tomando ese punto inicial como cero para obtener la primera medición en la semana 1 post iniciación tumoral. El crecimiento tumoral fue calculado en base a las mediciones realizadas semanalmente con calibre tomando en cuenta los diámetros mayor y menor de los tumores subcutáneos. Como se observa en la figura 10, una vez establecido el tumor el crecimiento fue similar para los tumores desarrollados en ambos grupos experimentales.

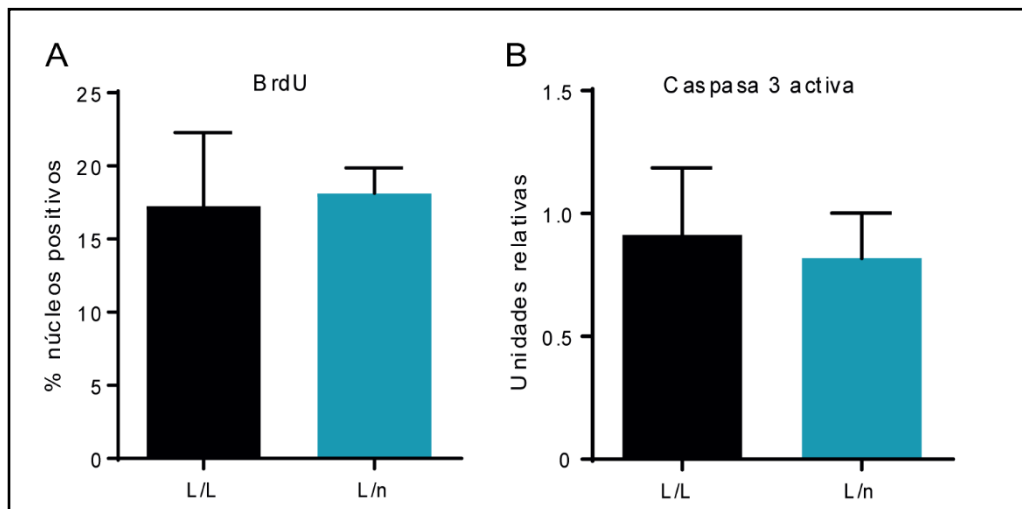


**Figura 10: La deficiencia local del circuito IGF-1/IGF-1R no modifica el crecimiento tumoral.** El volumen tumoral fue calculado en base a las mediciones de los diámetros mayor y menor realizadas con calibre semanalmente (diámetro mayor  $\times$  diámetro menor<sup>2</sup>). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DS (L/L vs L/n.  $p = NS$ , Test Mann-Whitney).

Para verificar el crecimiento tumoral se estudió la tasa de proliferación in vivo mediante la incorporación de BrdU (30 mg BrdU/ kg de peso corporal). La técnica de inmunohistoquímica para detectar la incorporación de BrdU pone de manifiesto el porcentaje de células en fase S tanto en los tumores desarrollados en ratones control (L/L) como en ratones haploinsuficientes para IGF-1R (L/n). El estudio se realizó comparando la proliferación en tumores con tiempos de desarrollo similares para ambos grupos experimentales (4, 5 y 6 semanas). Como se observa en la figura 11, no se

encontraron diferencias significativas en las tasas de proliferación tumoral en los tumores desarrollados en ratones L/L y L/n para ambos grupos (L/L vs L/n.  $p=NS$ , Test Mann-Whitney) (fig 11 A).

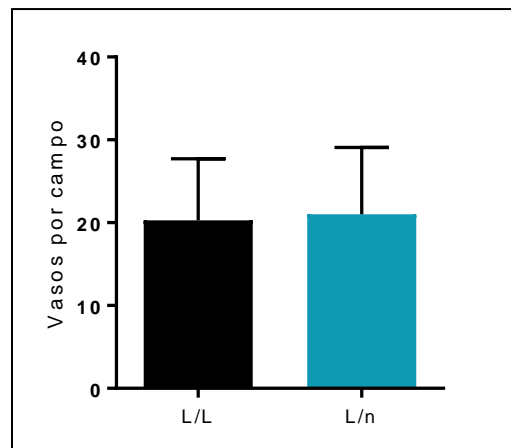
Asimismo, se estudiaron mediante *western blotting* (WB) los niveles de la proteína caspasa 3 activa (clivada) como marcador de apoptosis y tampoco se encontraron diferencias entre los tumores desarrollados en ambos grupos experimentales (fig 11 B).



**Figura 11: Proliferación y muerte celular.** A) Tres horas antes del sacrificio, se inyectó una solución de BrdU por vía intraperitoneal y posteriormente se disecaron los tumores para la realización de estudios por IHQ. Se procesaron tumores de diferentes volúmenes, en cuyos cortes se contaron al menos 4000 células (núcleos) por tumor. Los resultados se expresan como proporción de células (núcleos) positivas sobre el total. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DS (L/L vs L/n.  $p=NS$ , Test Mann-Whitney). B) Se extrajeron las proteínas de los tumores, se separaron por WB y se las reveló usando un anticuerpo que reconoce la fracción activa de la caspasa 3. Los resultados se expresan como proporción de caspasa 3 activa regularizadas por  $\beta$  actina (L/L vs L/n.  $p=NS$ , Test Mann-Whitney).

Las similares tasas de proliferación y apoptosis para los tumores desarrollados en ambos grupos experimentales reflejan lo registrado en el volumen tumoral (fig 10) y estaría indicando que, una vez establecido el tumor, la proliferación y muerte de las células MPC in vivo es la misma a pesar del microambiente deficiente del circuito IGF-1/IGF-1R.

Por otro lado se evaluó la densidad vascular de los tumores desarrollados en ratones controles (L/L) y en ratones L/n mediante la técnica de inmunohistoquímica para el factor de Von Willebrand, que pone de manifiesto a las células endoteliales (141). Para esto se comparó el número de vasos de tumores con volúmenes similares de ambos grupos experimentales. Se encontró que la vascularización de los tumores generados en un microambiente deficiente de IGF-1 es similar a la observada para los tumores desarrollados en condiciones control en cualquiera de los volúmenes estudiados (figura 12).



**Figura 12: Densidad vascular tumoral.** La densidad vascular fue calculada como el número de células/vasos positivos para Factor VIII en tumores de similar volumen de los dos grupos experimentales. Los resultados se expresan como el promedio de al menos 12 casos por grupo experimental con un promedio de 6 cortes por caso y se grafican como el promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n.  $p=NS$ , Test Mann-Whitney).

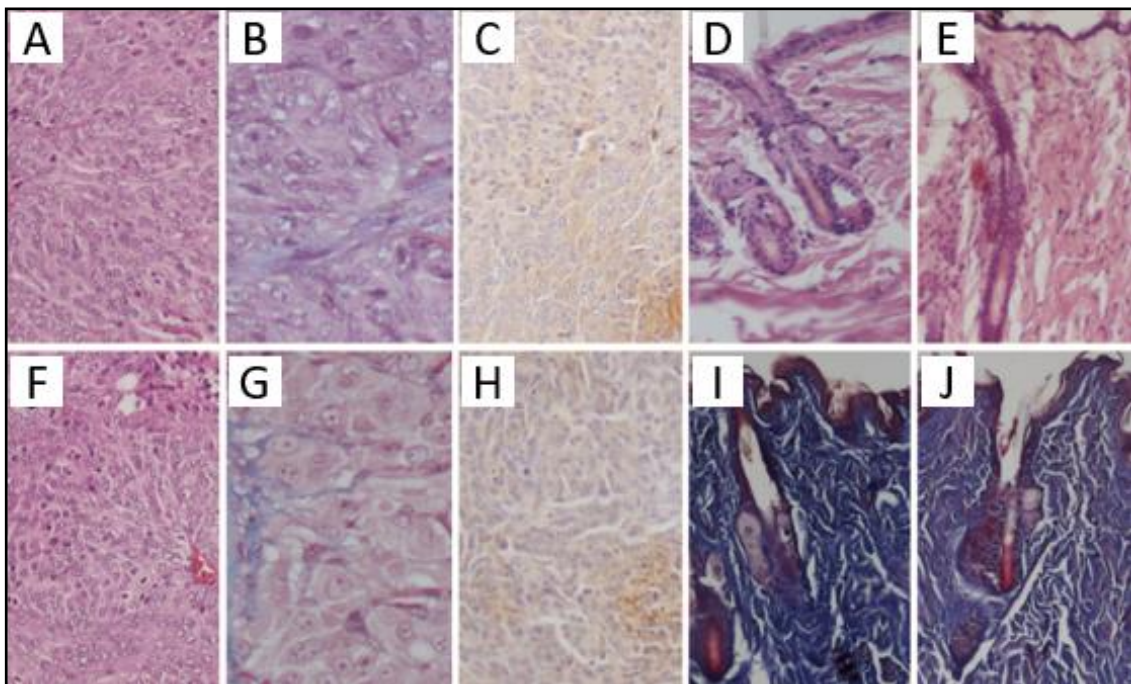
### Características histológicas

Los tumores desarrollados en ambos grupos experimentales presentaron características histológicas similares, con una alta proporción celular. Las células son poliédricas con núcleos ovales eucromáticos con nucléolo visible y se organizan en grupos separados por finos tabiques de tejido conectivo. La organización de las mismas es compatible con la de los feocromocitomas. Esto se puede evidenciar en la figura 13,

mediante las coloraciones de hematoxilina-eosina (paneles A y F) y la tricrómica de Masson (paneles B y G).

También se evaluó la presencia del IGF-1R mediante la técnica de inmunohistoquímica confirmando positividad tanto en los tumores desarrollados por los L/L como en los L/n (paneles C y H).

Por otro lado, como el modelo experimental de feocromocitoma utilizado se genera mediante inyección subcutánea, realizamos un estudio histológico de la piel de los ratones para intentar dilucidar si la deficiencia local del IGF-1R tiene efectos sobre su organización. Como se observa en la figura 13, las coloraciones topográficas de hematoxilina-eosina (paneles D y F) y tricrómica de Masson (paneles I y J) no mostraron diferencias evidentes en la organización de las células y el estroma tumoral entre ambos grupos experimentales.



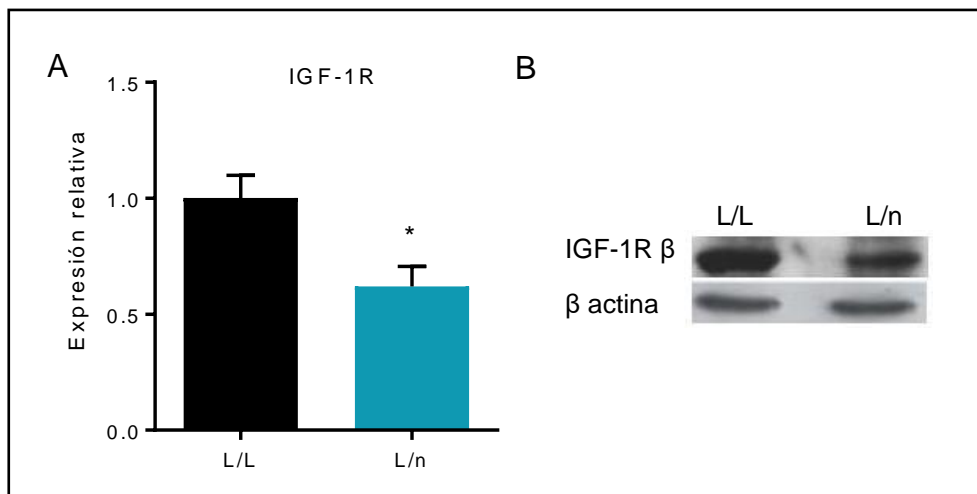
**Figura 13: Características histológicas.** Los tumores desarrollados en ratones L/L (A; B; C) como L/n (F; G; H) mostraron características histológicas similares de acuerdo a la coloración de H-E (A; F), tricrómica de Masson (B; G) Estudio por IHQ para detectar la expresión del IGF-1R (C; H). El estudio histológico de las biopsias de piel de ratones L/L (D; I) y ratones L/n (E; J) tampoco mostraron diferencias entre grupos. (Aumentos: 40x).



### Estudios in vitro

Con el fin de estudiar en mayor profundidad las interacciones de las células MPC con las células de estroma tumoral, y pensando en que la dermis es el primer lugar de contacto tras la inyección, se generaron cultivos primarios de fibroblastos de la dermis de ratones controles (L/L) y de ratones haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n). A partir de estos cultivos se estudió el efecto tanto de los factores solubles secretados por los fibroblastos, como el efecto de la interacción con los componentes de la matriz extracelular depositada por estas mismas células.

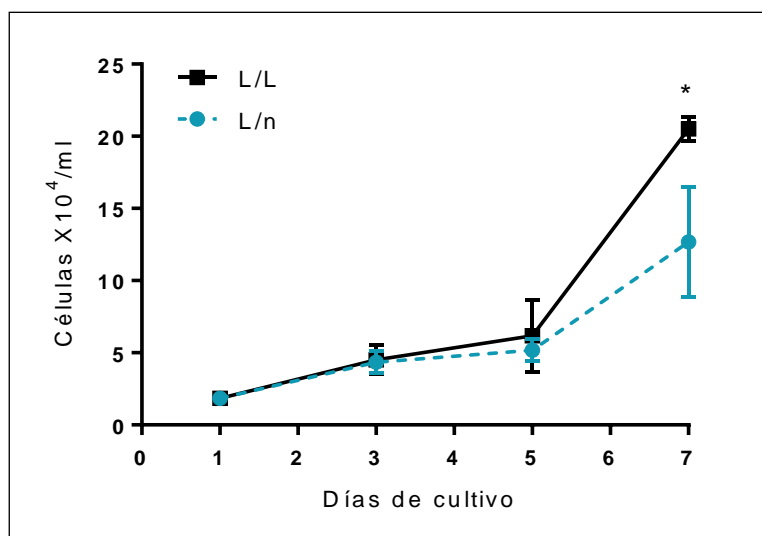
Para comenzar, confirmamos la reducción de la expresión del IGF-1R en los fibroblastos provenientes de ratones L/n comparados con fibroblastos de ratones control. La confirmación fue realizada tanto a nivel de ARNm, por PCR en tiempo real, como a nivel proteico mediante la técnica de WB (fig 14).



**Figura 14: Disminución de la expresión del IGF-1R en fibroblastos de ratones L/n.** A) PCR en tiempo real para IGF-1R en fibroblastos. Los valores de expresión fueron calculados usando el método de  $\Delta\Delta C_t$  y se presentan como expresión relativa en comparación a condiciones control (fibroblastos L/L). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n, \*  $p < 0.05$ , test de Mann Whitney). B) Western blot representativo para IGF-1R en extractos de proteínas de fibroblastos. Se utilizó  $\beta$  actina como control de carga.

### Efecto de los factores solubles secretados por los fibroblastos del estroma

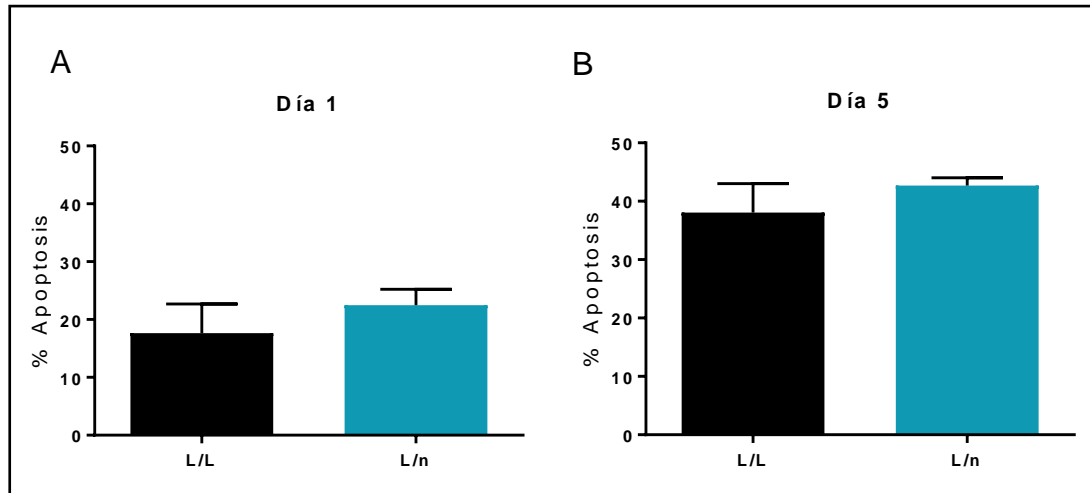
Para llevar a cabo este estudio se generaron medios condicionados con ambos tipos de fibroblastos (de ratones L/L y L/n) que se utilizaron para cultivar células MPC por 7 días. La proliferación de las células tumorales fue determinada mediante su conteo utilizando la coloración de exclusión con azul tripán. Los datos obtenidos muestran que las células MPC proliferan más cuando crecen en medios condicionados por fibroblastos provenientes de animales control (L/L) que cuando están sometidas a medios condicionados por fibroblastos haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n). Como se puede observar en la figura 15, la diferencia entre las dos condiciones se torna significativa al día 7 de cultivo.



**Figura 15: Efecto de medios condicionados por fibroblastos sobre la proliferación de células MPC.** Luego de obtener medios condicionados por fibroblastos provenientes de ratones control (L/L) y de ratones haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n) durante 24 h, los mismos se utilizaron para cultivar células MPC durante 1, 3, 5 y 7 días. La proliferación celular resultó significativamente mayor en presencia de medio condicionado por fibroblastos L/L. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n  $20 \pm 1$  vs  $13 \pm 2 \times 10^4$  células, \*  $p < 0,05$ , d 7, Test de Mann Whitney).

Por otro lado, utilizando la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio se estudió la apoptosis de las células MPC en contacto con los medios condicionados al día 1 y 5

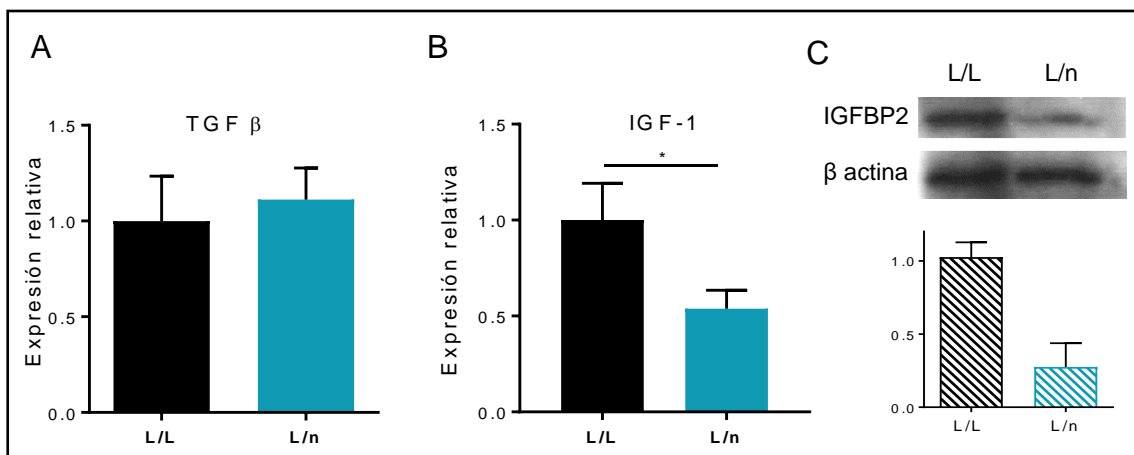
días de cultivo, sin encontrar diferencias cuando las células eran cultivadas con medios condicionados provenientes de ratones L/L o L/n (fig 16)



**Figura 16: Efecto de medios condicionados por fibroblastos sobre la apoptosis de células MPC.** Luego de obtener medios condicionados durante 24h por fibroblastos provenientes de ratones control (L/L) y de ratones haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n) los mismos se utilizaron para cultivar células MPC durante A) 1 o B) 5 días. La apoptosis fue evaluada luego de la tinción con naranja de acridina. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n.  $p=NS$ , Test Mann-Whitney).

Mediante la técnica del gen candidato se estudiaron posibles factores solubles que permitieran explicar la menor proliferación de las células MPC cultivadas con medios condicionados por fibroblastos de ratones L/n. Se sabe que los fibroblastos asociados al cáncer (FAC) secretan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e IGF-1 (147,148), importantes factores solubles que estimulan tanto la proliferación como la invasión de células tumorales (38,149). Se estudió si en los fibroblastos de ratones L/n, dada la deficiencia del IGF-1R, la expresión de dichos factores se encontraba modificada. No se encontraron diferencias en la expresión del ARNm del TGF $\beta$  cuando se comparó entre fibroblastos de ambos grupos experimentales (fig 17 A), mientras que la expresión del IGF-1 se encontró reducida en fibroblastos provenientes de ratones L/n (fig 17 B).

Por otro lado, también se estudiaron las proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs), que no solo modulan las acciones de los IGFs, sino que también tienen efectos independientes que pueden regular el crecimiento celular y la apoptosis (21). Específicamente se estudió la IGFBP2 que se expresa de manera abundante en varios tipos de cáncer (150) y se encontró a reducción en su expresión proteica en fibroblastos L/n en comparación con fibroblastos L/L (fig 17 C).



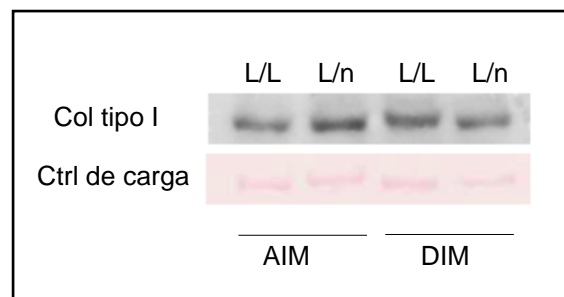
**Figura 17: Expresión de factores solubles en fibroblastos.** A, B) Estudio de la expresión de ARNm de factor de crecimiento transformante β (TGFβ) (A) y de IGF-1 (B) por PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados usando el método de  $\Delta\Delta C_t$  y se presentan como expresión relativa en comparación a condiciones control (fibroblastos L/L). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n, \*  $p < 0.05$ , test de Mann Whitney). C) Western blot representativo para IGFBP2 en extractos de proteínas de fibroblastos. Se utilizó β actina como control de carga. Se muestra en unidades arbitrarias la diferencia en la semicuantificación de bandas (L/L vs L/n, \*  $p < 0.05$ , test de Mann Whitney).

#### Efecto de los componentes de matriz extracelular secretados por los fibroblastos del estroma

Para estudiar los eventos tempranos en el sitio de inyección se buscó recrear las interacciones entre las células MPC y los componentes no solubles que constituyen la mayor parte de la dermis y que son secretados por los fibroblastos. Para esto se generaron matrices diferenciales a partir del cultivo de fibroblastos provenientes de

animales controles (L/L) y animales con haploinsuficiencia del IGF-1R (L/n) y el posterior irradiación en microondas para que solo quedaran los componentes inertes secretados por los fibroblastos (143).

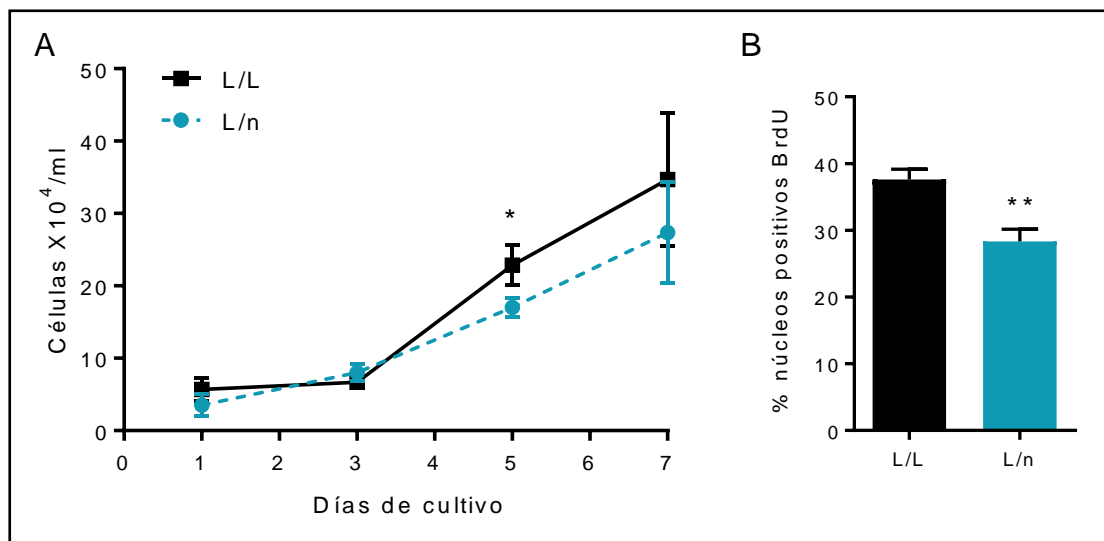
En una primera instancia se comprobó que el componente de matriz secretado por los fibroblastos en cultivo permanecía intacto. Para esto se obtuvieron extractos proteicos de los cultivos primarios antes y después de la irradiación en microondas. Dichos extractos se utilizaron para realizar la técnica de *western blotting* que fue revelada con un anticuerpo específico anti-colágeno tipo 1, uno de los componentes mayoritarios secretados por los fibroblastos. Los resultados revelaron bandas similares para las proteínas secretadas por los fibroblastos provenientes de ratones L/L y L/n antes y después de la irradiación, indicando que las mismas no sufrieron cambios estructurales significativos (fig 18).



**Figura 18: Proteínas de matriz depositadas por los fibroblastos en cultivo primario.** Se obtuvieron las proteínas secretadas por los fibroblastos provenientes de ratones L/L y L/n antes y después de la irradiación de los cultivos en microondas. Las mismas se corrieron en un gel SDS-PAGE y se revelaron con un anticuerpo anti-colágeno tipo1. Se observaron bandas de peso molecular similar antes y después de la irradiación en ambos grupos experimentales. **AIM:** antes de irradiación en microondas, **DIM:** después de irradiación en microondas.

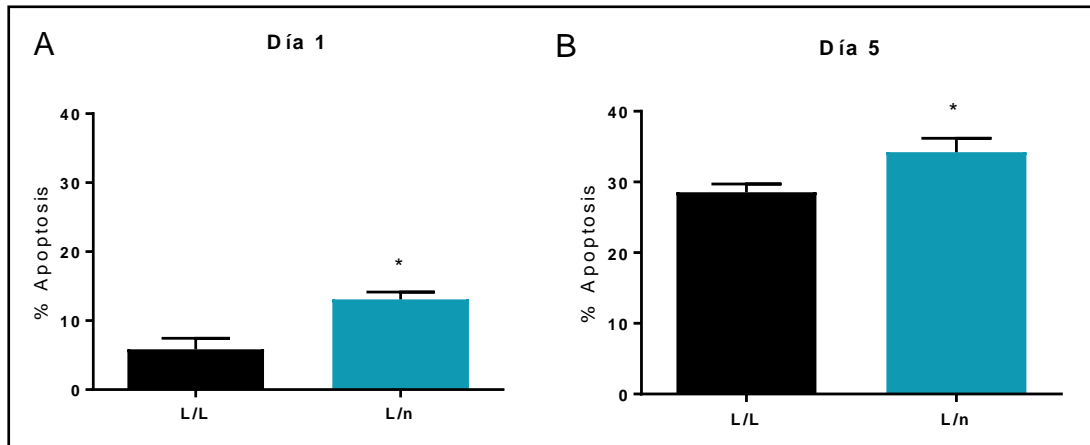
Las matrices generadas fueron utilizadas para cultivar células MPC y se calculó la proliferación de las mismas a distintos tiempos de cultivo por medio de conteo con la coloración de exclusión con azul tripán.

Se observó que la proliferación de las células MPC fue mayor cuando fueron cultivadas sobre la matriz generada por fibroblastos control (L/L) que cuando se las cultivó en matriz generada por fibroblastos provenientes de ratones L/n. La diferencia observada se torna significativa al quinto día de cultivo (fig 19 A). Esta diferencia en la proliferación celular fue corroborada mediante la técnica de incorporación de BrdU *in vitro*. Como se observa en la figura 19, existe una disminución significativa en el porcentaje de células MPC en fase S cuando las mismas fueron cultivadas sobre matrices generadas por fibroblastos de ratones L/n en comparación con la situación control (fig 19 B).



**Figura 19: Efecto de factores que componen la matriz extracelular secretada por fibroblastos sobre la proliferación de células MPC.** A) Luego del pasaje por microondas de cultivos primarios de fibroblastos provenientes de ratones L/L y L/n se generaron matrices diferenciales que se utilizaron para cultivar células MPC durante 1, 3, 5 y 7 días. La proliferación celular resultó significativamente mayor cuando las células fueron cultivadas sobre las matrices generadas por fibroblastos L/L. (L/L vs L/n  $23 \pm 2$  vs  $17 \pm 1 \times 10^4$  células, \*  $p < 0,05$ , d 7, Test de Mann Whitney). B) Las células MPC se cultivaron sobre matrices diferenciales por 5 días y se realizó la incorporación de BrdU. Se observó una mayor proliferación celular cuando las células fueron cultivadas sobre matrices generadas por fibroblastos L/L. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  DS. (L/L vs L/n  $38 \pm 2$  vs  $28 \pm 2\%$ , \*\* $p < 0,005$ , d 7, Test de Mann Whitney).

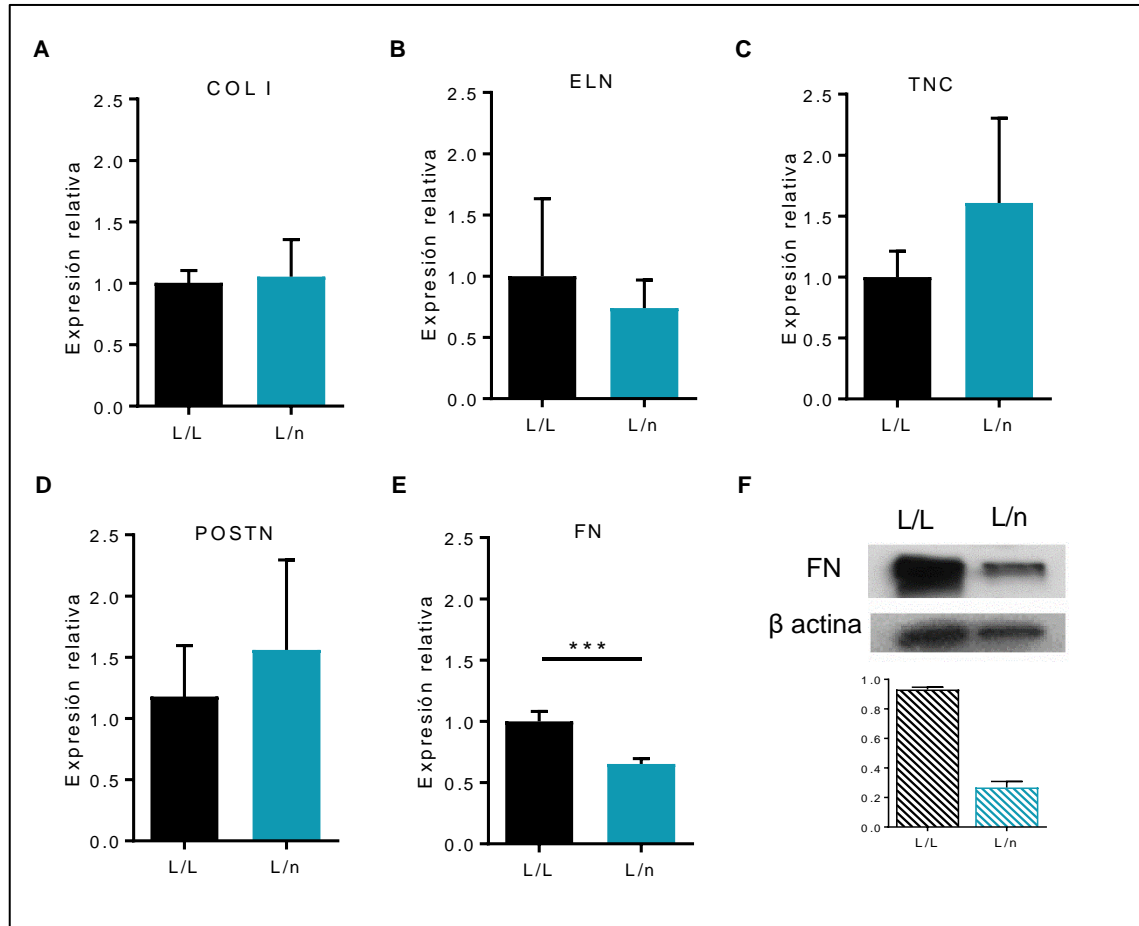
Utilizando las mismas condiciones de cultivo se estudió la apoptosis de las células MPC mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Se detectó una mayor proporción de células apoptóticas cuando las mismas eran cultivadas sobre matrices generadas por fibroblastos de ratones L/n tanto al día 1 como al día 5 de cultivo (fig 20).



**Figura 20: Efecto de las matrices diferenciales generadas por fibroblastos sobre la apoptosis de células MPC.** Luego de obtener las matrices diferenciales generadas por fibroblastos provenientes de ratones control (L/L) y de ratones haploinsuficientes para el IGF-1R (L/n) se utilizaron para cultivar células MPC durante A) 1 o B) 5 días. La apoptosis fue evaluada luego de la tinción con naranja de acridina. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n, \*  $p < 0.05$ , test de Mann Whitney).

Para focalizar en la interacción entre las células MPC y la matriz extracelular se realizó un estudio de la expresión de varias proteínas de matriz secretadas por los fibroblastos. Por un lado, se estudió el colágeno de tipo I, elastina y fibronectina, por ser de las proteínas de matriz más representativas. Por otro lado, también se estudió la expresión de periostina y tenascina cuyo aumento en respuesta a IGF-1 había sido demostrado en fibroblastos de diversas neoplasias. De los genes investigados, el único para el que se encontró diferencia en la expresión de ARNm entre ambos grupos experimentales fue la fibronectina, siendo menor en los fibroblastos L/n en comparación con los

fibroblastos control (fig 21 E). Esta disminución fue verificada a nivel de proteína mediante *western blotting* (fig 21 F).



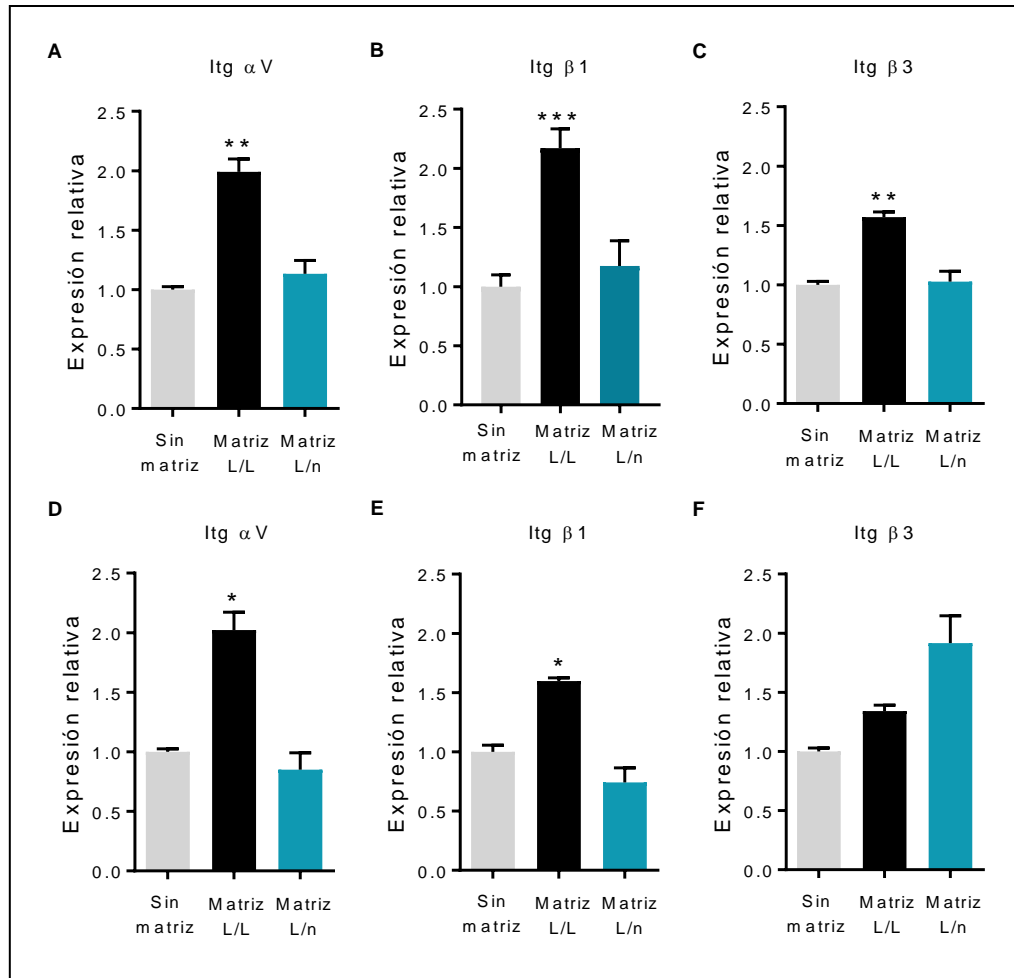
**Figura 21: Expresión de factores de matriz (no solubles) en fibroblastos.** A, E) Estudio de la expresión de ARNm de colágeno (A), elastina (B), tenascina (C), periostina (D) y fibronectina (E) por PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados usando el método de  $\Delta\Delta Ct$  y se presentan como expresión relativa en comparación a condiciones control (fibroblastos L/L). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS. (L/L vs L/n, \*\*\* $p < 0.001$ , test de Mann Whitney). F) Western blot representativo para fibronectina en extractos de proteínas de fibroblastos. Se utilizó  $\beta$ actina como control de carga. Se muestra en unidades arbitrarias la diferencia en la semicuantificación de bandas (L/L vs L/n, \* $p < 0.05$ , test de Mann Whitney).



### Expresión de integrinas en las células tumorales

Las integrinas son moléculas heterodiméricas que se ubican en la membrana de las células, con un dominio extracelular y otro intracelular que permiten la adhesión, migración y proliferación celular al reconocer motivos específicos de unión en la matriz extracelular (151). Están compuestas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  que determinan la especificidad por el sustrato al que se pueden unir. Debido a los cambios en composición de matriz secretada por fibroblastos provenientes de animales L/n, se estudió la expresión de tres subunidades particulares  $\alpha$ V,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3 - que funcionan como receptoras para fibronectina, tenascina y periostina- en las células MPC.

Por PCR en tiempo real se encontraron expresión de ARNm de las tres subunidades en las células MPC en cultivo. Asimismo, luego de un día de cultivo se detectó un aumento en la expresión las subunidades  $\alpha$ V,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3 en las células sembradas sobre matrices diferenciales generadas por fibroblastos L/L en comparación con las mismas células cultivadas en una superficie sin matriz. Este incremento no fue observado cuando las MPC se cultivaron sobre matrices de fibroblastos L/n (fig 22 A, B y C). Estas diferencias en la expresión permanecen luego de 5 días de cultivo para las subunidades  $\alpha$ V y  $\beta$ 1 (fig 22 D, E y F).



**Figura 22: Expresión de integrinas en células MPC. Estudio de la expresión de las subunidades de integrina  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  por PCR en tiempo real.** Las células MPC fueron cultivadas sobre placas sin matriz (barras grises), matrices L/L (barras negras) o matrices L/n (barras blancas) por 1 (A-C) o 5 días (D-F). Los valores fueron calculados usando el método de  $\Delta\Delta Ct$  y se presentan como expresión relativa en comparación a condiciones control (células cultivadas sin matriz- barras grises). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS (L/L vs L/n, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  ANOVA, post test de Tukey).

## *Discusión*

Los resultados de este trabajo muestran que *in vivo*, la haploinsuficiencia del IGF-1R en las células del microambiente tumoral disminuye la incidencia y prolonga el período de latencia del feocromocitoma murino mientras que no afecta vascularización, proliferación ni crecimiento del tumor.

Si bien un 10% de los ratones L/n no desarrollaron tumor, una vez que lo hacen la progresión del volumen tumoral es similar a la observada para los tumores desarrollados en ratones control. Esto sugeriría que una vez que las células logran anclarse a la matriz extracelular, la deficiencia local del IGF-1 no sería un impedimento para su crecimiento.

La tasa de proliferación de las MPC, expresada como el porcentaje de células en fase S, resulta similar entre los grupos al igual que ocurre con la apoptosis en los tumores. Estas evidencias respaldan la falta de diferencia en el volumen tumoral entre ambos grupos que fue observada en el estudio. Cuando estos tumores se desarrollan en un modelo de deficiencia sistémica de IGF-1 (ratones LID), se observa un aumento en la apoptosis intratumoral que no llega a ser inhibido por los altos niveles de hormona de crecimiento (GH) o de insulina asociados a la reducción del IGF-1 circulante (107). Nuestros resultados demuestran que ni la proliferación ni la apoptosis de las células MPC se ve afectada por la reducción de la actividad del circuito IGF-1/IGF-1R en las células del microambiente tumoral.

En concordancia con lo antes mencionado, el análisis histológico de los tumores desarrollados en los ratones L/L y L/n no mostró diferencias significativas sugiriendo que el reclutamiento de las células estromales como los fibroblastos no se ve afectado por la haploinsuficiencia del IGF-1R.

Se sabe que tanto en las células tumorales como en las del estroma el IGF-1 estimula la expresión del ARNm del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (79,80). Por otro lado, también ha sido descrito que ratones con delección del gen del IGF-1R

en células endoteliales (ratones VENIFARKO) muestran una disminución en la neovascularización de la retina en condiciones de hipoxia (91). En el modelo utilizado en este estudio se hipotetizó que las células endoteliales podrían experimentar una menor migración debido a la haploinsuficiencia del IGF-1R, lo que generaría una disminución en la vascularización tumoral. Asimismo, una reducción de la señalización del IGF-1 en los fibroblastos podría causar una menor producción de VEGF contribuyendo también a una menor angiogénesis(80).

En contraposición a lo esperado, no se encontraron diferencias en la vascularización de los tumores desarrollados en un microambiente deficiente de IGF-1R (ratones L/n). Esto podría deberse a que la deficiencia del IGF-1R en las células endoteliales es parcial y no total, lo cual estaría generando un fenotipo atenuado. Además, si bien las células del estroma serían parcialmente deficientes en IGF-1R, las células tumorales no lo son, por lo cual podrían compensar la disminución de factores angiogénicos – como el VEGF- y no se afectaría al reclutamiento de células endoteliales.

Por otro lado, si bien se ha demostrado el rol central del IGF-1R en la respuesta angiogénica a la hipoxia en ratones VENIFARKO, estos ratones no muestran desarrollo de vasculatura anormal o inmadura en condiciones normales de oxígeno (91). Este hecho pone en evidencia la importancia de otros factores en el proceso angiogénico, con lo cual, en nuestro modelo tampoco podemos descartar un posible rol para los mismos.

Los resultados obtenidos in vivo sugieren un rol para el circuito IGF-1/IGF-1R local en los eventos tempranos de anclaje de las células en el punto de inyección permitiendo el posterior desarrollo del feocromocitoma experimental. Hipotetizamos que cuando las células tienen su primer contacto con un microambiente deficiente de IGF-1R (ratones L/n) encuentran mayor dificultad para sobrevivir que la que encuentran en un microambiente con niveles normales del receptor (ratones L/L). Esta dificultad se ve

reflejada en la menor incidencia y el mayor tiempo de latencia observado para los tumores desarrollados en los ratones L/n.

Estudios previos han demostrado que la piel de ratones con delección total del gen del IGF-1R es muy delgada, con un reducido número de células en la epidermis y una baja tasa de división celular. Además, la falta de expresión del IGF-1R perturba la formación y organización de cultivos de piel tridimensionales dando lugar a estructuras desorganizadas (152). En el modelo utilizado en el presente estudio, la deficiencia parcial del IGF-1R no parece interferir en las características histológicas de la dermis. Esto descarta la existencia de diferencias groseras en la constitución de la piel que pudieran afectar el anclaje y sobrevivencia de las células tumorales modificando la incidencia del feocromocitoma experimental. Teniendo esto en cuenta, el trabajo se enfocó en el estudio de los fibroblastos de ratones L/L y L/n, considerándolos las células más representativas de la dermis, lugar donde las células inyectadas tienen su primer contacto.

Los resultados *in vitro* revelan que los fibroblastos provenientes de la piel de los ratones secretan factores solubles que influyen en el crecimiento de las células MPC, y que esta secreción se ve afectada por la haploinsuficiencia del IGF-1R. Se sabe que los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) proveen señales potencialmente oncogénicas a las células que los rodean. Uno de los factores más representativos que media estas acciones es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) que estimula directamente la proliferación e invasión de las células tumorales (38). Estudios de microarreglos en la línea celular de fibroblastos CCL-171 han demostrado la sobreexpresión de genes de la familia de Wnt y de TGF $\beta$  luego del estímulo con IGF-1(153). En el presente trabajo se estudió por PCR en tiempo real la expresión del TGF $\beta$  en fibroblastos L/L y L/n sin encontrar diferencias entre los mismos. De todas formas, ante la imposibilidad de medir la actividad del factor en los medios condicionados no se puede descartar una

posible regulación diferencial del TGF $\beta$  a nivel proteico o de actividad en nuestro sistema de estudio.

Recientemente el grupo de Tommelein y colaboradores ha demostrado que el IGF-1 es secretado por fibroblastos irradiados y se lo ha asociado a la resistencia química y sobrevida de las células tumorales en cáncer de colon (149). En el modelo de haploinsuficiencia del IGF-1R se encontró una reducción en la síntesis de IGF-1 por parte de los fibroblastos. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que el IGF-1 regula el desarrollo del feocromocitoma al inhibir la apoptosis y estimular la proliferación, invasión y crecimiento independiente del anclaje de las células tumorales (107). Estos antecedentes permiten proponer que el IGF-1 derivado de los fibroblastos podría contribuir a la sobrevida de las células MPC y al establecimiento del feocromocitoma murino en los ratones L/L, mientras que la reducción de su secreción en los ratones L/n desfavorecería dichos eventos.

Las matrices generadas por los fibroblastos en el contexto de deficiencia del IGF-1R también tienen efectos sobre la proliferación y sobrevida de las células tumorales. El colágeno de tipo I, la elastina y la fibronectina son las proteínas más representativas de la matriz extracelular en la piel. Mas aún, se sabe que la síntesis y secreción de colágeno de tipo I están estimuladas por IGF-1 (154). Estudios realizados en fibroblastos de cáncer de mama han detectado cambios en la expresión de algunos genes en respuesta al IGF-1. Dentro de estos se destacan factores como la periostina, involucrada en la metástasis en hueso y en el proceso de angiogénesis (155) y la tenascina, que estimula la proliferación de las células tumorales (156). Entre todas las proteínas de matriz mencionadas solo se encontraron diferencias de expresión para la fibronectina, que resultó menor en los fibroblastos L/n comparada con la de los fibroblastos L/L. La estimulación en la expresión de fibronectina en respuesta a IGF-1 ya había sido comunicada previamente (157).

Asimismo, Pais y colaboradores han descrito que ratones con delección del gen de IGF-1 sufren hipoplasia pulmonar debida a la disminución en la expresión de fibronectina. En estos ratones también se encontró disminuida la expresión de IGFBP2 (148). En el modelo experimental de fibroblastos L/n se describe la disminución en la expresión a nivel proteico de IGFBP2 en comparación con los fibroblastos control. Se propone entonces que la menor señalización del IGF-1 en los fibroblastos L/n debida a la haploinsuficiencia del IGF-1R podría ser responsable, al menos en parte, de la reducción en la expresión de la fibronectina y la IGFBP2.

La interacción de las células con la matriz extracelular es mediada por integrinas, que actúan no solo como moléculas de adhesión, sino también como transductores de señales intracelulares que regulan ciertas funciones específicas (158,159). Las células ancladas a sustrato mantienen su crecimiento y viabilidad mediante la activación de cascadas de señales de supervivencia como las de las MAP quinasas y la proteína-quinasa B (PKB/AKT) (160). Cuando las células no pueden anclarse a la MEC las señales de supervivencia no se activan y se desencadenan vías apoptóticas que llevan al fenómeno conocido como anoikis, o muerte por falta de adhesión (161).

En el presente trabajo se analizó la expresión de las subunidades de integrinas  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  que están involucradas en la interacción de las células con diversos componentes de la MEC, específicamente el dímero  $\alpha V\beta 1$  que es uno de los receptores de fibronectina más importantes (162). Se encontró que cuando las células MPC crecen sobre matrices generadas por fibroblastos L/n (que poseen una menor cantidad de fibronectina) la expresión de las tres subunidades de integrinas se ve reducida. Con anterioridad ha sido publicado que la expresión de las integrinas puede ser regulada por sus ligandos (163). Por lo tanto, la reducción en la síntesis de fibronectina por los fibroblastos L/n podría contribuir a la disminución en la expresión de las integrinas  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$  en las células MPC cuando estas crecen en contacto con dichas matrices. La



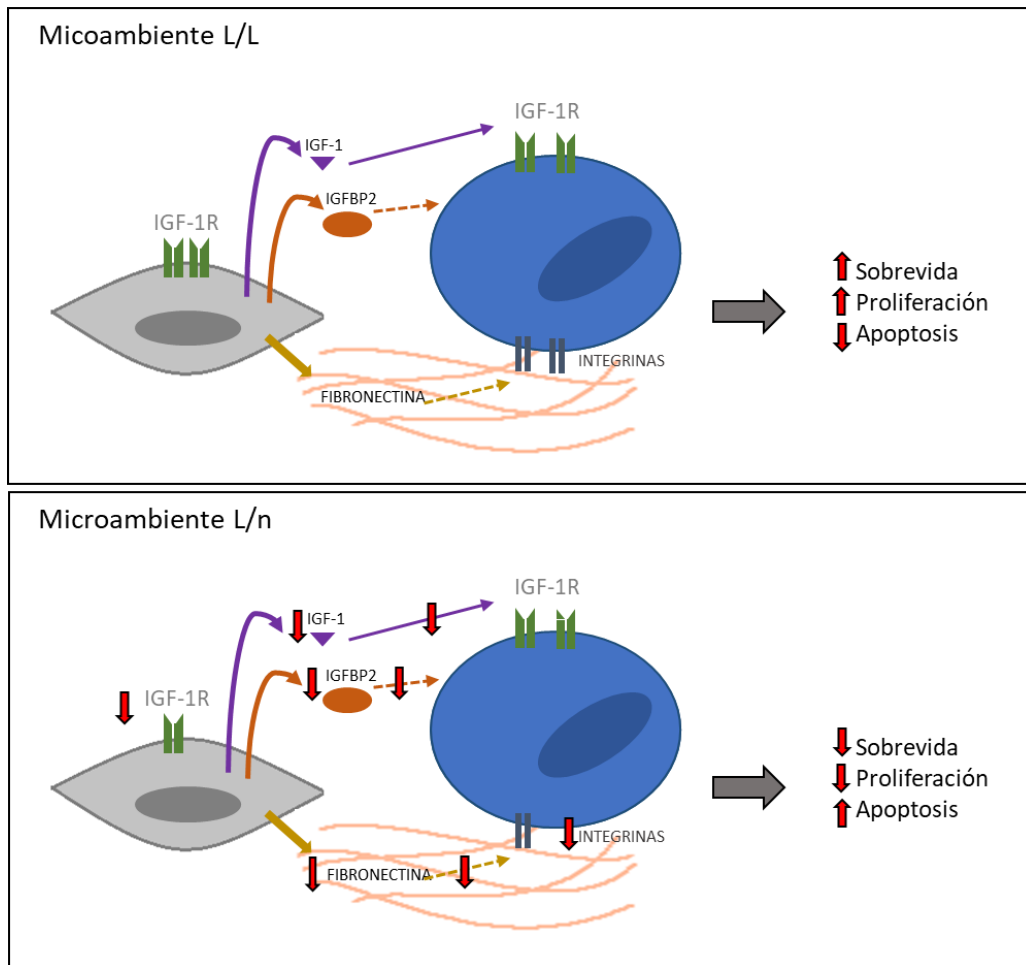
menor expresión de las integrinas en las células tumorales podría generar una menor adhesión celular, la disminución en las señales de supervivencia y consecuentemente la muerte por anoikis.

Por otro lado, se ha descrito que la IGFBP2 secretada por los FACs es capaz de reducir la anoikis de células cancerígenas mediante la estabilización de la proteína antiapoptótica MCL-1 (164). Por lo tanto, la reducción en la síntesis de IGFBP2 como se observa en los fibroblastos L/n podría ser un mecanismo adicional por el cual las células MPC sufren un mayor porcentaje de apoptosis por falta de anclaje.

## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**

En resumen, la disminución en la producción de fibronectina, IGF-1 e IGFBP2 generadas por la haploinsuficiencia en los fibroblastos L/n, en conjunto con la disminución en la expresión de las integrinas en las células MPC está disminuyendo la supervivencia de dichas células en el punto de inyección. Lo que observamos *in vitro* como la disminución en la tasa de proliferación de las MPC podría ser pensado como la mayor dificultad para sobrevivir y proliferar luego del primer contacto con un microambiente deficiente en IGF-1R como vemos *in vivo*.

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado una asociación entre la expresión del IGF-1R y la malignidad en feocromocitomas y paragangliomas humanos, mostrando evidencia del impacto del IGF-1 circulante en el desarrollo del feocromocitoma experimental *in vivo* e *in vitro*. Con este trabajo demostramos que la haploinsuficiencia del IGF-1R en los fibroblastos tiene efectos sobre la supervivencia de las células de feocromocitoma antes del establecimiento tumoral. Considerando la relevancia de las interacciones entre las células tumorales y su microambiente, los resultados del presente trabajo aportan y fortalecen el conocimiento del rol del circuito local IGF-1/IGF-1R presente en las células no tumorales lo que podría ser de interés para el desarrollo de nuevas y más específicas estrategias terapéuticas



**Figura 23: La haploinsuficiencia del IGF-1R en los fibroblastos afecta la supervivencia de las células MPC.** Los factores solubles y de matriz producidos por los fibroblastos contribuyen al desarrollo del feocromocitoma murino. La disminución en la producción de IGF-1, IGFBP2 y fibronectina en los fibroblastos haploinsuficientes, en conjunto con la menor expresión de integrinas en las células MPC tendría implicancias en la supervivencia de las mismas en el punto de inyección. Las líneas punteadas representan mecanismos desconocidos.

## *Capítulo 2*

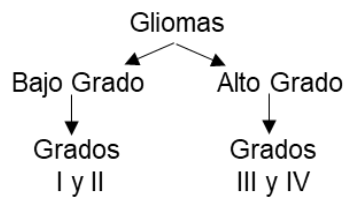
## OBJETIVO ESPECÍFICO 2

*Caracterizar la expresión y el impacto de componentes del sistema de los IGFs en tumores de sistema nervioso central de pacientes pediátricos y su vinculación con los diferentes grados de malignidad.*

Nos proponemos:

**2 a.-** determinar los niveles de expresión de *IGF-1*, *IGF-2*, *IGF-1R* e *IR* en muestras de tumores del SNC de población pediátrica.

Para ello, se realizó un estudio prospectivo en pacientes pediátricos con tumores del sistema nervioso central sin tratamiento previo que fueron sometidos a cirugía en nuestro hospital. Al momento de la cirugía se colectaron las muestras, se extrajo el ARN y se estudió la expresión de los ligandos (*IGF-1*, *IGF-2*) y receptores (*IGF-1R*, *IR*) del sistema de los IGFs. El análisis se realizó para los tumores de estirpe glial, grupo de tumores de SNC más frecuentes en la población pediátrica. Se evaluó la expresión de los genes estudiados comparando los tumores según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2016 (111) como se expone a continuación:



**2 b.-** evaluar el impacto de la sobreexpresión y/o localización subcelular del *IGF-1R* en el fenotipo *in vitro* e *in vivo* en una línea celular de glioblastoma humano.

Para ello utilizamos una línea de glioblastoma humano (U-87 MG) y generamos líneas con expresión elevada y estable del *IGF-1R* y caracterizamos el fenotipo celular en cultivo y su fenotipo *in vivo* mediante xenotransplantes en ratones inmunodeficientes.

## *Materiales y métodos*

**Pacientes:**

Esta investigación se realizó de acuerdo con los principios de respeto de la autonomía de las personas, beneficencia y justicia, además de cubrir la expectativa de descubrir nuevas formas de beneficiar la salud de las personas. Todos los procedimientos del estudio clínico se llevaron a cabo bajo el compromiso de los investigadores de cumplir estrictamente las normas éticas que rigen las investigaciones en humanos, enumeradas en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, junio 1964, y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre 1975, 35ª Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, octubre 1983, 41ª Asamblea Médica Mundial Hong Kong, septiembre 1989, 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996, 52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia, octubre 2000, además de la Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002 y la Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004, y la 59ª Asamblea Médica Mundial Seúl, Corea, octubre 2008).

Teniendo en cuenta que se trata de investigación que involucra a menores, solo se incluyeron aquellos casos en que los pacientes y sus padres y/o tutores legales hubieran dado su consentimiento o asentimiento (según correspondiere) luego de haber sido debidamente informados sobre los detalles del estudio. Se aseguró la confidencialidad del uso de la información con resguardo de su privacidad, según la ley 25.326 de Protección de los datos personales de Octubre del Año 2000.

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Docencia e Investigación, así como del Comité de Ética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires y ha sido aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

### Obtención y procesamiento de tejidos humanos

Las muestras analizadas provienen de cirugías de pacientes con tumores de sistema nervioso central que fueron operados en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, que no hubieran recibido tratamiento de radioterapia previo a la cirugía y hubieran firmado el consentimiento/asentimiento correspondiente (se adjuntan modelos en sección anexos).

Las mismas fueron almacenadas a -70 °C en RNAlater para favorecer la conservación del ARN, utilizado para los estudios moleculares descritos a continuación.

### Línea celular de glioblastoma

Para el modelado de este tipo tumoral se utilizó la línea celular de glioblastoma humana U-87 MG (U87) adquirida comercialmente, cultivada en medio MEM suplementado con 10 % suero fetal bovino. Las células fueron mantenidas en estufa gaseada con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### Establecimiento de líneas celulares con sobreexpresión del IGF-1R

Las células U87 fueron transfectadas utilizando liposomas (Lipofectamine 3000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con el vector pEGFP conteniendo el cDNA del IGF-1R como proteína de fusión con la proteína fluorescente verde en su extremo carboxilo terminal (IGF-1R-GFP, células con sobreexpresión del IGF-1R) o simplemente la proteína fluorescente verde (GFP) (células sin sobreexpresión) gentilmente cedidos por la Dra Rosemary O'Connor (University College, Cork, Irlanda). Una vez transfectadas, se seleccionaron clones utilizando el antibiótico G418 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA) y se verificó la sobreexpresión del IGF-1R tanto a nivel de proteína (*Western blot*) como a nivel de ARNm (PCR cuantitativa en tiempo real) como se describe a continuación.



Establecimiento de líneas celulares con IGF-1R no nuclear

Partiendo del vector pEGFP conteniendo el cDNA para la proteína de fusión IGF-1R-GFP, se generaron variantes del mismo mediante la técnica de mutagénesis dirigida al mutar las lisinas por argininas en las posiciones 1025, 1100 y 1120 impidiendo la SUMOilación de dichos residuos y posterior translocación del IGF-1R al núcleo (vector GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup>). Brevemente, se diseñaron cebadores específicos para mutar cada uno de los 3 residuos (ver secuencias en la tabla 3) y se utilizó la ADN-polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) para mutarlos de manera secuencial. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo de 1 minuto a 95 °C, seguido por 20 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 5 minutos a 68 °C y un ciclo final de 5 minutos a 68 °C. El producto de PCR fue tratado con 1 µl de *Dpn* I (10 U/ µl) por una hora a 37 °C de modo de digerir las hebras parentales no mutadas del plásmido.

Cebadores utilizados para mutagénesis:

Aminoácido a mutar	Secuencia de los cebadores 5'-3'
Lys 1025 Arg	Fw: CGAAGCTTCTGTG <b>ATG</b> AGGGAGTTCAATTGTCACCATG
	Rv: CATGGTGACAATTGAACTCCCT <b>CAT</b> CACAGAAGCTTCG
Lys 1100 Arg	Fw: CCTCAACGCCAAT <b>AGG</b> TCGTCCACAGAGACC
	Rv: GGTCTCTGTGGACGAA <b>CCT</b> ATTGGCGTTGAGG
Lys 1130 Arg	Fw: GGTAGCCGAAGATTTACAGTC <b>AGA</b> ATCGGAGATTTTGG
	Rv: CCAAATCTCCGAT <b>TCT</b> GACTGTGAAATCTTCGGCTACC

**Tabla 3:** secuencias de los cebadores utilizados para mutar de manera específica las lisinas 1025, 1100 y 1120 por argininas

Una vez obtenido el vector mutado, el mismo fue amplificado mediante replicación en bacterias. Con 2 µl del producto de PCR digerido se transformaron 200 µl de

bacterias competentes mediante choque térmico: se incubaron durante 30 minutos en hielo, luego 1 minuto y 30 segundos a 42 °C, seguidos de 3 minutos en hielo. Se resuspendieron en 200 µl de medio SOC e incubaron una hora a 37 °C con agitación (300 rpm) y luego se sembraron en placas de LB-Agar con 50 µg/ml de kanamicina. Para finalizar, las placas se incubaron 16 hs en estufa a 37 °C.

Parte de las colonias obtenidas fueron amplificadas en cultivos líquidos de 5 ml de medio LB-kanamicina con agitación durante 16 h a 37 °C, y luego se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit de miniprep comercial Econospin (Epoch Life Science, Missouri, TX, USA). La correcta mutación de las lisinas fue verificada mediante secuenciación utilizando el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Posteriormente a la confirmación de las mutaciones se amplificó una cantidad mayor de bacterias de modo de obtener una mayor cantidad de ADN plasmídico que fue purificado utilizando el kit comercial Plasmid Maxi KIT (QIAGEN, Hilden, Germany). Para finalizar, las células U87 fueron transfectadas con el vector GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup> utilizando liposomas (Lipofectamine 3000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se seleccionaron clones utilizando el antibiótico G418 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se verificó la sobreexpresión del IGF-1R tanto a nivel de proteína (*Western blot*) como a nivel de ARNm (PCR cuantitativa en tiempo real) como se describe a continuación.

#### Estimulo con IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1)

Para evaluar diversos efectos en respuesta a IGF-1 los cultivos celulares fueron incubados con rhIGF-1 (Genentech Inc, CA, USA) como ha sido descripto previamente (107). La concentración utilizada en todos los experimentos fue de 50 nM, que recrea concentraciones fisiológicas de dicho factor.

### Inhibición del IGF-1R

Para evaluar los efectos de la inhibición de la actividad de IGF-1R y corroborar que los efectos observados en respuesta a rhIGF-1 fueran específicos, los cultivos celulares fueron incubados con el inhibidor dual OSI 906 (Selleckchem, Huston, TX, USA), compuesto que inhibe la autofosforilación tanto del IGF-1R como del receptor de insulina. En todos los casos se realizó una preincubación de una hora de los cultivos celulares antes del estímulo con rhIGF-1. Las concentraciones utilizadas estuvieron en el rango de 0,25 a 1  $\mu$ M, como ha sido descrito previamente (165).

### Muerte celular

Las células fueron incubadas con medios de cultivo sin SFB, en presencia o ausencia del estímulo de rhIGF-1, y se evaluó la apoptosis de las mismas utilizando los métodos descritos en el capítulo 1 o mediante la técnica de *western blotting* revelando las proteínas con un anticuerpo que reconoce la caspasa 3 total.

### Translocación del IGF-1R al núcleo

Se estudió la localización subcelular del IGF-1R luego de un estímulo con rhIGF-1 50 nM por 8 h, condiciones que han sido descritas previamente (71). Brevemente, las células en cultivo fueron privadas de SFB durante 24 h. A continuación, se realizó la estimulación de las mismas con rhIGF-1 50 nM por 8 h en medio de cultivo sin agregados. Finalizado este período, las células fueron lavadas con PBS y procesadas para su estudio por inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular según corresponda. Para verificar la especificidad del estímulo con IGF-1 para la translocación del IGF-1R al núcleo, las células fueron preincubadas durante una hora con el inhibidor OSI906 0,5  $\mu$ M.

### Inmunofluorescencia

Se realizó la técnica de inmunofluorescencia para detectar la localización intracelular del IGF-1R endógeno de las células U87 luego del estímulo con rhIGF-1. Brevemente, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Luego de 8 h de estímulo con rhIGF-1 50 nM se lavaron con PBS y fueron fijadas por 30 minutos con metanol: ácido acético (3:1). El ADN se desnaturalizó con una solución de 70 % etanol/0,2 M NaOH por 3 minutos y se fijaron finalmente con etanol 70 % y 100 % por un minuto. El bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó durante 40 minutos a temperatura ambiente con 1 % suero de caballo en PBS. La incubación con el anticuerpo primario que reconoce la subunidad  $\beta$  del IGF-1R (dil 1/750 en solución de bloqueo) se realizó durante 16 horas a 4 °C en cámara húmeda, seguida por tres lavados de 5 minutos con PBS y la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo (dil 1/500) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara fría. Para finalizar, los cubreobjetos fueron incubados con Hoechst (5  $\mu$ g/ml) por 30 minutos y montados sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector Lab, CA, USA). Los preparados fueron analizados en el microscopio confocal Olympus FV1000 y las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Fluoview FV1000. En el caso de los clones con sobreexpresión del IGF-1R, la localización intracelular de las proteínas de fusión IGF-1R-GFP y GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup> fue monitoreada mediante el estudio de la fluorescencia de la proteína fluorescente verde. En estos casos, luego del estímulo por 8 h con rhIGF-1 (y la preincubación con el inhibidor OSI906 en los casos en que corresponde) las células fueron lavadas con PBS e incubadas con una solución de Hoechst (5  $\mu$ g/ml) por 15 minutos, para luego ser montadas como fue descrito anteriormente. Para este análisis se utilizó el microscopio Carl-Zeiss AxioScope A1, que posee filtros para DAPI (azul) y FITC (verde). Las imágenes fueron obtenidas con la cámara AxioCam ERc 5s y el software AxioVision LE.

### Ensayos de migración

Para evaluar el potencial migratorio de las células se realizaron ensayos de cicatrización de heridas. Para los mismos, las células fueron sembradas para obtener una monocapa subconfluyente luego de 48 h se realizó una herida y se lavó para evitar que las células desprendidas vuelvan a adherirse. Se monitoreó fotográficamente a las 18, 24 y 36 h siguientes para registrar el proceso de migración celular hacia la superficie descubierta en presencia o ausencia de estímulo con rhIGF-1 y con el inhibidor dual OSI906.

### Medición de la producción de lactato en cultivos celulares

Para evaluar la producción de lactato las células fueron incubadas en placas de 24 pocillos con o sin estímulo de rhIGF-1, preincubadas con OSI906 en el caso que correspondiera. Luego de 24 h de cultivo, se colectaron los medios condicionados y se los reservó para medir lactato. Las células fueron lisadas con 500  $\mu$ l de EDTA 2 mM, sonicadas y su contenido de ADN medido por fluorometría utilizando bisBenzimida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA).

Para la medición de lactato, a 200  $\mu$ l de medio condicionado se agregaron 400  $\mu$ l de ácido perclórico 8 %, se incubó 5 minutos en hielo y centrifugó 10 minutos a 2800 rpm para precipitar posibles restos celulares. A 50  $\mu$ l de sobrenadante se le agregaron 6 partes de una solución conteniendo NAD, LDH y buffer glicina 0,6 M (Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de la muestra a 340 nm, utilizando un estándar de lactato 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l y ácido perclórico como blanco.

Los valores de lactato obtenidos fueron regularizados a la cantidad de ADN por pocillo y se expresan como  $\mu$ g lactato/ $\mu$ g ADN.

### Medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Para el estudio de actividad de LDH las células fueron incubadas de manera similar a la descrita para medición de la producción de lactato. Luego de 24 h las células fueron lavadas y sonicadas en 300 µl de solución fisiológica. Se tomaron 30 µl de la suspensión para medir contenido de ADN (en dilución 1/10 con EDTA 2 mM) como fue descrito previamente.

El resto de la suspensión fue centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm para obtener un sobrenadante limpio que fue medido en el autoanálizador COBAS C311 (Roche Diagnostics, IN. USA), en el laboratorio central de análisis del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Los valores de LDH obtenidos fueron regularizados a la cantidad de ADN por pocillo y se expresaron como mU LDH/µg ADN.

### Estudio de la formación de gotas de lípidos

Para el estudio del contenido de lípidos acumulados en el cultivo celular se realizó la tinción con el colorante *Oil Red OI* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO. USA). Brevemente, las células fueron sembradas en cámaras de cultivo LabTek (CellPoint, MD. USA), e incubadas o no durante 24 h con rhIGF-1 50 nM. Luego de este periodo fueron lavadas con PBS y fijadas con formol 10 % en PBS durante 1h. A continuación, las células se colorearon con una solución de rojo oleoso (*Oil RedI*, 0,2 %) durante 30 minutos, se las lavó con agua y contracoloró con hematoxilina. Por último, se las montó con glicerol 60 % y se procedió a su evaluación utilizando el microscopio Nikon Eclipse 50i con aumento 100x para su análisis.

### Evaluación de la expresión génica

Para la evaluación de la expresión génica utilizando muestras de pacientes o muestras obtenidas de procedimientos experimentales (*in vitro* o *in vivo*), se procedió como ha sido descrito en el capítulo 1.

Los genes evaluados en este capítulo fueron IGF-1R, IGF-1, IGF-2, receptor de insulina (IR) y el transportador de glucosa GLUT 1, utilizando la expresión de TBP como gen de referencia. Las secuencias de los cebadores y sus concentraciones usadas se muestran en la tabla suplementaria 2.

Evaluación de la expresión de las isoformas del receptor de insulina (IR)

Las dos isoformas del receptor de insulina, que solo difieren en 33 pares de bases (exclusión o no del exón 12 del gen) fueron diferenciadas utilizando la técnica de PCR en tiempo final. Para esto se utilizaron 2 cebadores que hibridan con el gen del IR en el exón 11 y 13, cuyas secuencias habían sido descriptas previamente (166).

Forward: 5'CTGGGAGAGGCAGGCATATGACAGTGAGCTGTTCG3'

Reverse: 5'CCTGGTTGCAAGCCTGCAGATCGATGCGATAGCCC3'

Mediante retrotranscripción se obtuvieron los ADN copia de los tumores humanos o líneas celulares como se describe en el capítulo 1. A partir de estos se realizó la amplificación de las isoformas del IR mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima GoTaq (Promega, Madison, WI, USA) y los cebadores previamente descriptos. Las condiciones del ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 92 °C, seguido por 40 ciclos de 92 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos y 72 °C 30 segundos. Finalmente, un ciclo de 10 minutos a 72 °C.

Una vez obtenidos los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa 1,5 % y teñidos con bromuro de etidio para verificar la presencia de los fragmentos de interés. La presencia de una banda de 473 pb se tomó como indicadora de la isoforma A del IR, mientras que bandas de 509 pb fueron indicadoras de la isoforma B.

Evaluación de la expresión proteica

1) Proteínas totales: El contenido celular total fue lisado como ha sido descrito en el capítulo 1.

2) Fraccionamiento subcelular: para estudiar la composición proteica de la fracción nuclear y no nuclear de las células se procedió como ha sido descrito previamente (24). De manera breve, las células fueron incubadas en buffer de lisis (5 mM EDTA, 1 % IGEPAL, 1 mM DTT e inhibidores de proteasas) en hielo durante 10 minutos, luego fueron centrifugadas por 10 minutos a 12000 xg y se conservó el sobrenadante como fracción “no nuclear”. El resto fue lavado y centrifugado nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en buffer nuclear (20 mM Tris, 1 %SDS, 5 mM EGTA, 0,5 % tritón, 150 mM NaCl e inhibidores de proteasas) y sonicado. Se procedió con una última centrifugación de la cual se separó el sobrenadante que representa la fracción “nuclear” de las células.

Una vez obtenidas las proteínas totales o las fracciones “nuclear” y “no nuclear” mediante las técnicas descritas anteriormente, se procedió con la medición y evaluación de la expresión proteica como ha sido descrito en el capítulo 1.

Los anticuerpos utilizados en este capítulo fueron los siguientes: anti-IGF-1R  $\beta$  (#3027), anti-pIGF-1R  $\beta$  (#3918), anti-AKT (#9272), anti-pAKT (#9271), anti-MAPK 42-44 (#9102), anti-pMAPK 42-44 (#9101), anti-caspasa 3 (#9662), anti-S6K (#2708) y anti-pS6K (# 9205) y anti- $\beta$  actina (#4970) de Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Anticuerpos anti-ciclina D1 (SC-718) y anti-lámina B (SC-6217) de Santa Cruz Inc (Dallas, TX, USA). Anticuerpo anti-pPDH, subunidad E1- $\alpha$  (NB110-93479) de Novus Biologicals (Centennial, CO, USA). Anticuerpo anti-FAS (610962) de BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Anticuerpo anti-GAPDH (MAB374) de Millipore (Darmstadt, Alemania).



### Modelo animal de glioblastoma

Se utilizaron ratones macho inmunodeficientes (N:NIH (S)- Fox 1<sup>nu</sup>) de 6-8 semanas de edad. Los mismos fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata y mantenidos según la guía del cuidado y uso de animales experimentales (138) recibiendo agua y comida *ad libitum* en un régimen de luz-oscuridad de 12 h.

Se inyectaron  $1,5 \times 10^6$  células U87 con o sin sobreexpresión del IGF-1R, o que expresaran el vector mutante GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup>.

Los animales fueron monitoreados diariamente y los tumores medidos con calibre. Al momento del sacrificio, los ratones fueron inyectados con una solución de bromodesoxiuridina, para calcular el índice de proliferación tumoral. Los tumores fueron disecados y procesados para su estudio histológico y molecular como ha sido descrito en el capítulo 1.

Cálculo del tamaño muestral: El tamaño muestral se calculó considerando que este es un estudio de contraste de hipótesis, donde se comparan principalmente dos medias (volúmenes tumorales). De nuestros datos preliminares sabemos que a los 10 días de la inyección con 2 o 5 millones de células U87, se detecta la primera diferencia significativa en la media de los volúmenes tumorales entre ambos grupos, que es de aproximadamente 57 mm<sup>3</sup>. Asumiendo un comportamiento similar, considerando la diferencia mínima de 60 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral a detectar entre ambos grupos (células con o sin sobreexpresión del IGF-1R), con un nivel de confianza o seguridad del 95 % (alfa de 0.05), un poder estadístico del 90 % (beta de 0.10) para la hipótesis unilateral se necesitarán 5 ratones por grupo experimental.

Procesamiento histológico de tumores murinos

Los tumores fueron procesados y estudiados como fue descrito en el capítulo

1. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la expresión del IGF-1R y la proliferación celular.

Por otro lado se realizaron tinciones para poner de manifiesto distintos componentes del estroma tumoral como se describe brevemente a continuación:

- 1) Tinción de PAS: utilizada para poner de manifiesto glicoproteínas y proteoglicanos. Brevemente, los cortes fueron desparafinados e hidratados, se los incubó 15 minutos con ácido periódico y luego del lavado con agua destilada se los incubó con reactivo de Schiff 30 minutos a 4 °C. Para contracolorar los núcleos se utilizó hematoxilina de Harris, se los deshidrató y montó con bálsamo de Canadá.
- 2) Tricrómico de Masson modificado: la tinción se utiliza para marcar fibras de colágeno, que adquieren un tono verde. Los cortes se desparafinaron, hidrataron y tiñeron con hematoxilina ferrica por 10 minutos (seguido de 10 minutos de lavado en agua corriente). A continuación se tiñeron con una solución de escarlata-fuccina y luego se trataron con ácido fosfotúngstico al 5 %. Para finalizar se tiñeron con una solución de verde luz que se diferenció con ácido acético 1 %, para luego ser deshidratados y montados con bálsamo de Canadá.
- 3) Impregnación con plata: la técnica para retículo de Gomori pone de manifiesto las fibras reticulares que adquieren una tonalidad oscura (marrón-negra). Para la misma los cortes fueron desparafinados e hidratados, se oxidaron con permanganato de potasio al 2 % y diferenciaron con una solución de metabisulfito de potasio 2 %. A continuación se incubaron con sulfato férrico de amonio 2 % e impregnaron con una solución de plata amoniaca. Para finalizar, se realizó una reducción en formol 10 % y los cortes fueron deshidratados y montados en bálsamo de Canadá.

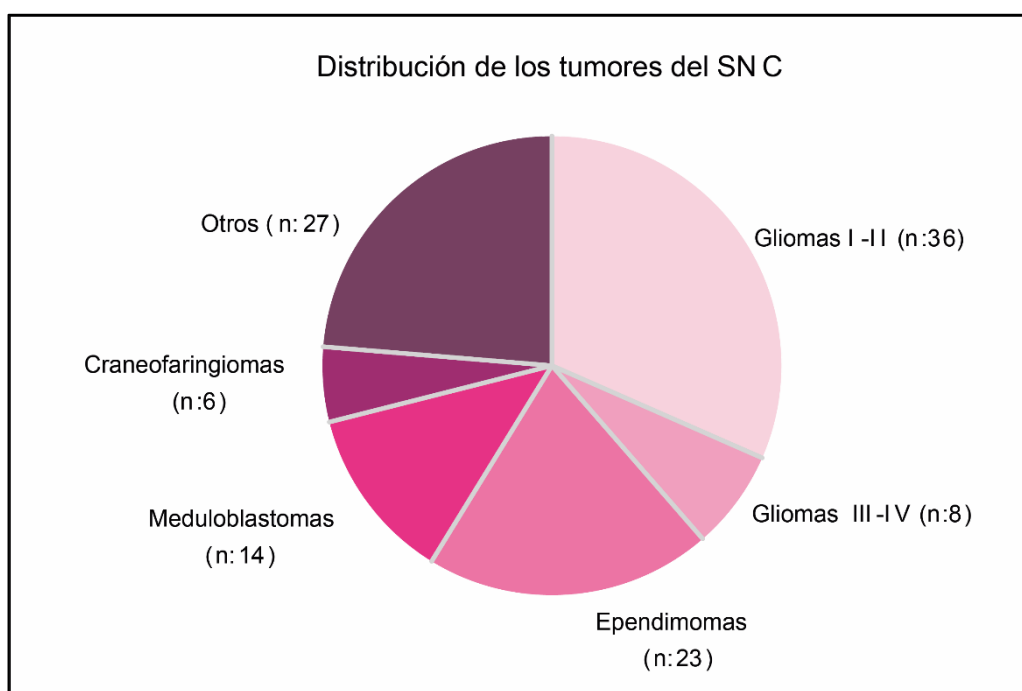
# *Resultados*

### **Estudios con muestras de pacientes**

Se realizó un estudio prospectivo (junio 2012 a agosto 2017) de paciente pediátricos con tumores de SNC sin tratamiento previo que fueron sometidos a cirugía en nuestro hospital.

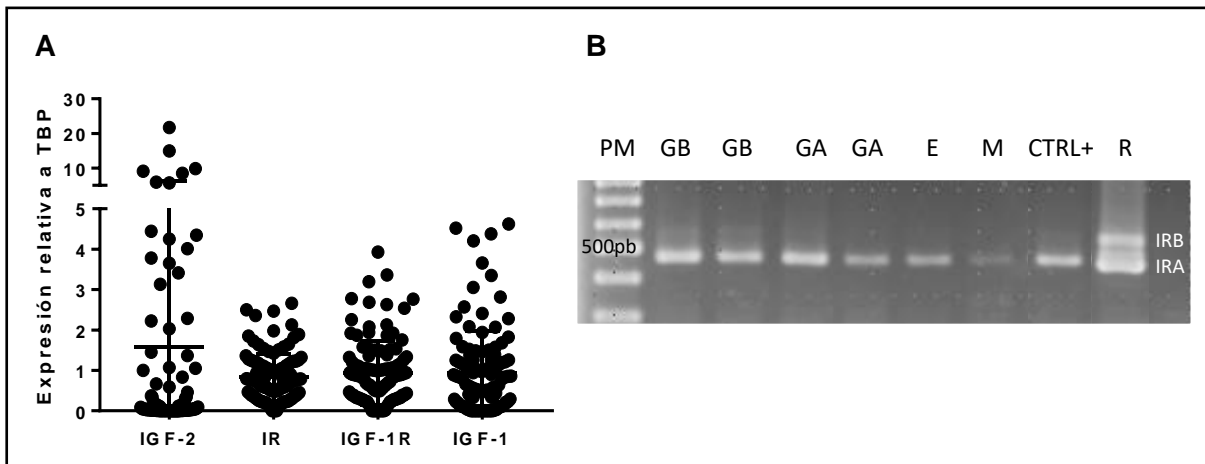
Para el mismo fueron incluidos 113 pacientes (61 niñas y 52 niños) con una mediana de edad de 7.63 años y un rango intercuartil de 3.44 a 11.92 años, la mayoría de los cuales se encontraban en estadio prepuberal. Las muestras tumorales fueron clasificadas en el servicio de patología de Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud del año 2016 (111).

La distribución de los tumores de nuestra población pediátrica estudiada se muestra en la figura 24.



**Figura 24: Distribución de los tumores de SNC analizados según su diagnóstico.** Las muestras fueron clasificadas por el servicio de patología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Se grafican los grupos tumorales más representativos.

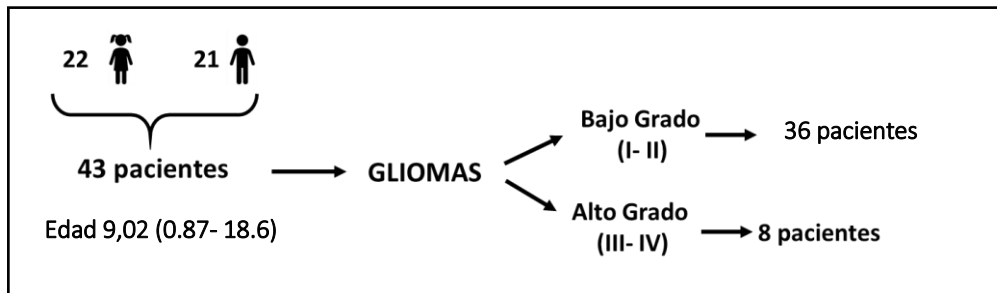
En las muestras obtenidas se procedió con el análisis de expresión de los ligandos y receptores del sistema de los IGFs. De las 113 muestras analizadas se pudo detectar la presencia de IGF-1 en 98 casos, IGF-2 e IGF-1R en 105 casos e IR en 109 casos. La expresión del IGF-2 resultó la más variable entre todos los tumores (fig 25). Por PCR en tiempo final se confirmó que la isoforma A del IR fue predominante en todos los tumores estudiados (fig 25).

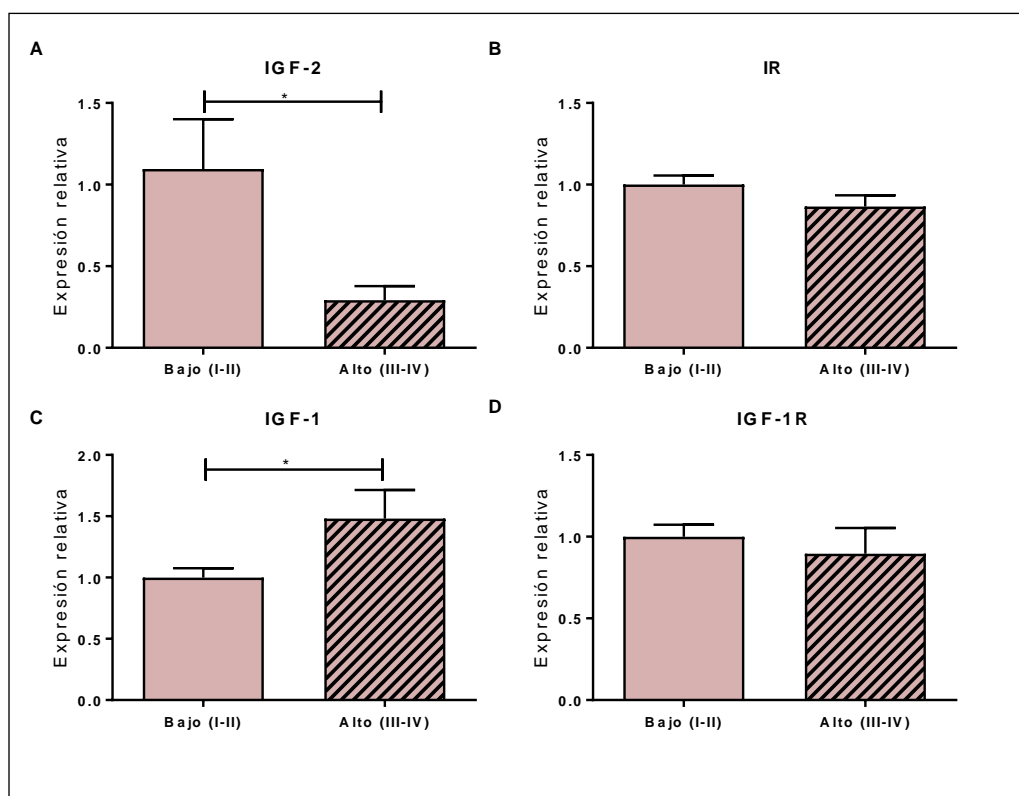


**Figura 25: Expresión de genes del sistema de los IGFs en muestras tumorales.** A) Cuantificación relativa de la expresión de ARNm de IGF-2, IR, IGF-1R e IGF-1 regularizados a la expresión de TBP. El valor obtenido para cada tumor por cada gen se muestra como un punto independiente B) Estudio de la expresión de las isoformas del IR. Las mismas fueron amplificadas mediante PCR en tiempo final utilizando cebadores específicos y luego separadas en gel de agarosa 1,5%. Las bandas denotan la presencia de la isoforma A (473pb) y B (509pb). Se muestran gel representativo de gliomas de bajo grado (GB), gliomas de alto grado (GA), ependimomas (E), meduloblastomas (M), control positivo para IRA y riñón (R).

Se continuó el estudio analizando los tumores más frecuentes en este grupo etario, que como se mencionó en la Introducción, es el grupo de gliomas. Se analizaron 43 muestras de tumores gliales que fueron clasificadas según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en el año 2016, quedando los tumores separados por grado de malignidad como se muestra en el gráfico de la figura

26. De los tumores analizados, el 56% tenía ubicación infratentorial, el 43% ubicación supratentorial y uno solo de los tumores provenía de una ubicación intramedular.





**Figura 27: Expresión de los componentes del sistema de los IGFs en muestras de tumores de estirpe glial.** Estudio de la expresión de ARNm de IGF-2 (A), IR (B), IGF-1 (C) e IGF-1R (D) por PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados usando curvas de cuantificación relativa y se presentan como expresión relativa en comparación a los tumores de bajo grado. Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS. (Bajo vs alto grado, \* $p < 0.05$ , test de Mann Whitney).

### **Estudios in vitro**

Para realizar los estudios in vitro, nos basamos en estudios previos de nuestro grupo de trabajo que indican que la localización subcelular del IGF-1R estaría asociada a la gradación tumoral y a la evolución clínica de la enfermedad en los niños. Asimismo, los resultados de los estudios de expresión realizados en las muestras de los pacientes de este trabajo de tesis muestran que IGF-1 se expresa en mayor cantidad en los gliomas de alto grado. Así, podemos suponer que en este tipo tumoral el circuito de los IGFs que mayor importancia cobra es el circuito IGF-1/IGF-1R.

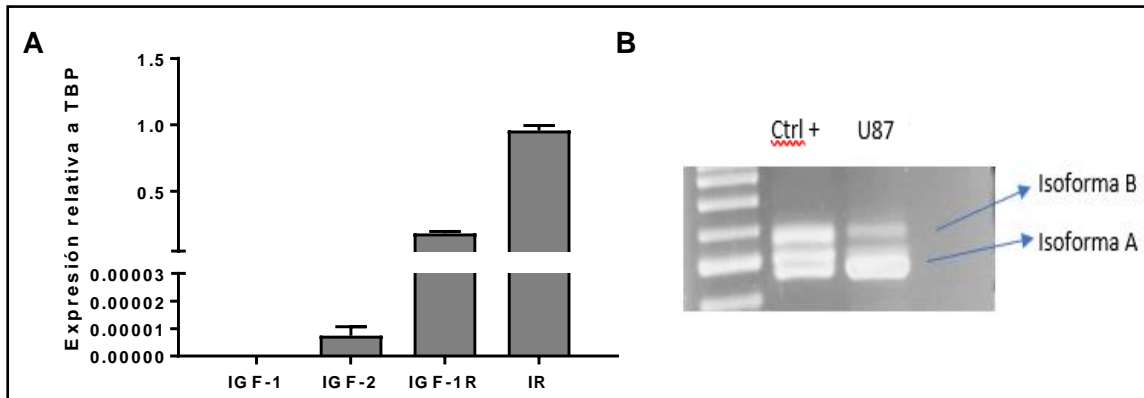
Para dilucidar el impacto de la expresión y localización subcelular del IGF-1R en estos tumores, utilizamos una línea celular de glioblastoma U87, células que sobreexpresan la molécula nativa del IGF-1R y células con expresión de una variante del IGF-1R que no puede migrar al núcleo celular.

### **Caracterización del sistema de los IGFs en la línea celular de glioblastoma humano U87**

Para poder utilizar las células U87 como modelo de estudio, verificamos la expresión endógena de los componentes del sistema de IGFs que son de nuestro interés, así como la funcionalidad del IGF-1R y su capacidad de traslocar al núcleo.

En primera instancia, se realizó el estudio de la expresión de ambos ligandos (IGF-1 e IGF-2) y de los receptores IGF-1R e IR. Las expresiones se relativizaron a la expresión en estas células de la proteína de unión a la *TATA box* (TBP), como se muestra en la figura 28.





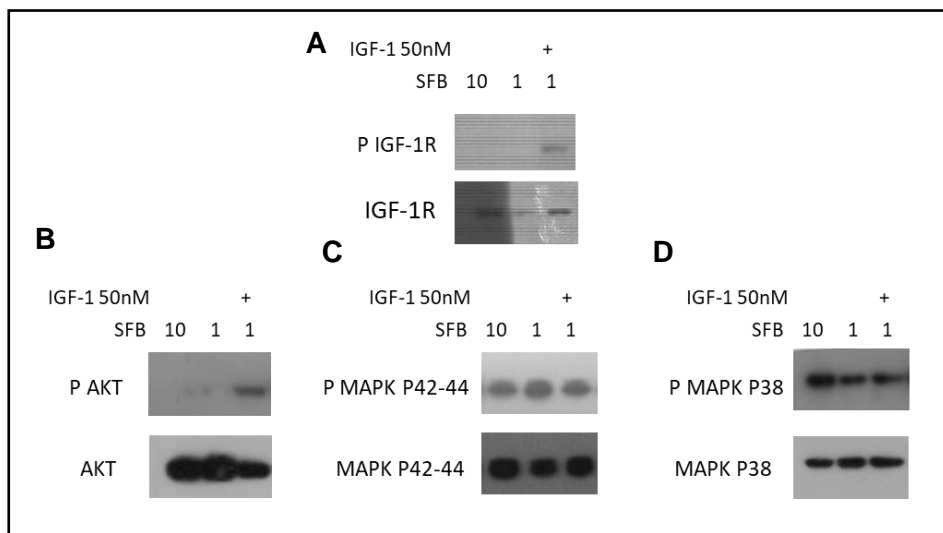
**Figura 28: Expresión basal de genes del sistema de los IGFs en la línea celular U87.** A) Cuantificación relativa de la expresión a nivel de ARNm de IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IR regularizados a la expresión de TBP. La misma fue estudiada en células U87 en condiciones basales. Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS. B) Estudio de la expresión de las isoformas del IR. Las muestras fueron amplificadas mediante PCR en tiempo final utilizando cebadores específicos y luego separadas en gel de agarosa 1,5 %. Las bandas denotan la presencia de la isoforma A (473 pb) y B (509 pb). Se muestran gel representativo la línea celular U87 y riñón como control positivo para ambas isoformas.

El nivel de expresión de IGF-2 fue muy bajo, en promedio cien mil de veces menor que la de la TBP, mientras que no se pudo detectar expresión del IGF-1. Por otro lado, fue posible determinar el nivel de expresión de ambos receptores del sistema de los IGFs, siendo la expresión del IR comparable a la de la TBP. La expresión del IGF-1R fue aproximadamente un 20 % menor que la de la TBP, lo que concuerda con publicaciones anteriores que indican que la expresión del receptor en las células U87 es baja (128). También se caracterizó la expresión de las isoformas del IR en la línea celular, encontrándose que la isoforma predominante es la isoforma A (fig 28).

Una vez determinada la expresión del IGF-1R, se determinó la funcionalidad del mismo luego del estímulo con IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1). Las células en cultivo fueron estimuladas por tiempos cortos (10 min) con rhIGF-1, se extrajeron sus proteínas y a partir de las mismas se realizó la técnica de *western blotting*. Como podemos observar en la figura 29, luego del estímulo con IGF-1 se produce la fosforilación del

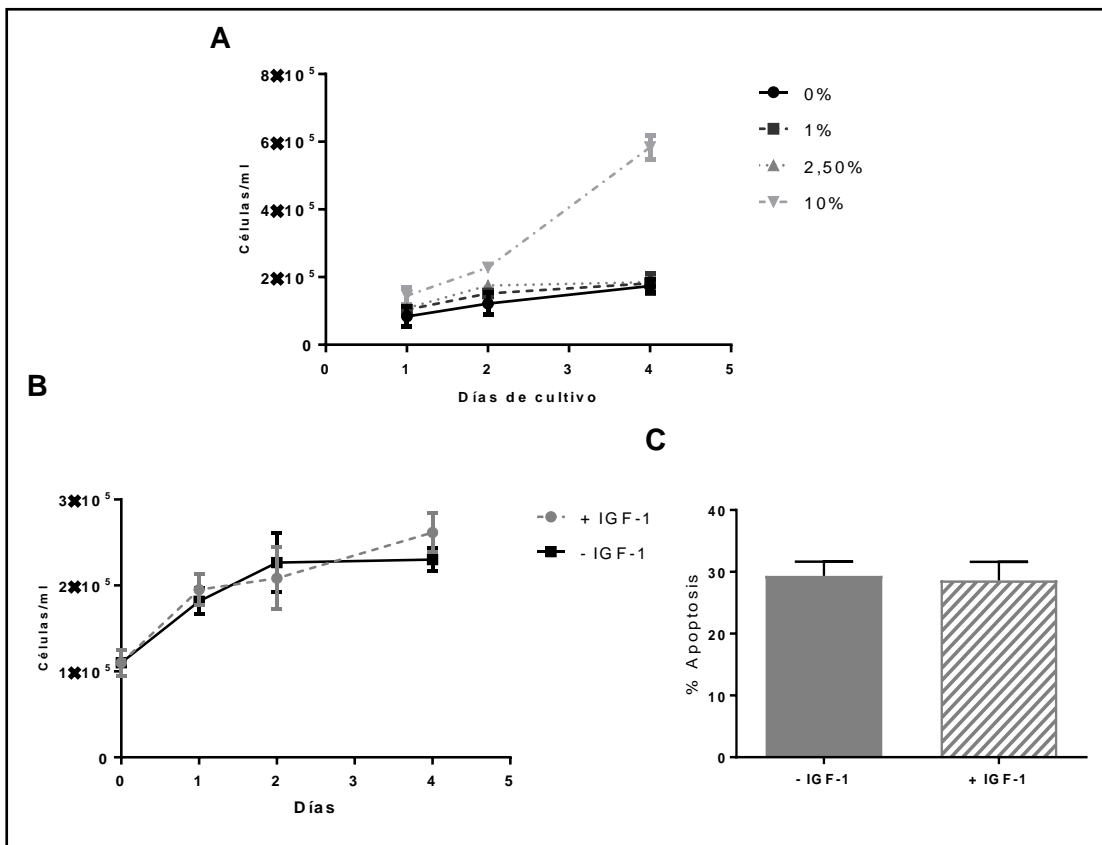
IGF-1R. Este fenómeno se traduce en la fosforilación de la AKT, quinasa que se encuentra debajo en la vía de señalización del IGF-1R (fig 29).

A diferencia de lo descrito para la AKT, en esta línea celular parece existir una activación constitutiva de las vías de las MAPK P38 y MAPK 42-44, ya que las mismas se encuentran en su forma activa, fosforilada, aún en ausencia del estímulo con IGF-1 (fig 29).



**Figura 29: Activación del IGF-1R y vías de señalización en respuesta al IGF-1.** Luego del estímulo de las células por 10 minutos con IGF-1 50nM se extrajeron las proteínas y se las separó por wb. Las membranas fueron reveladas con los anticuerpos de interés, para evidenciar las siguientes proteínas: IGF-1R (A), AKT (B), MAPK P42-44 (C) y MAPK P38 (D) tanto en su forma fosforilada como total.

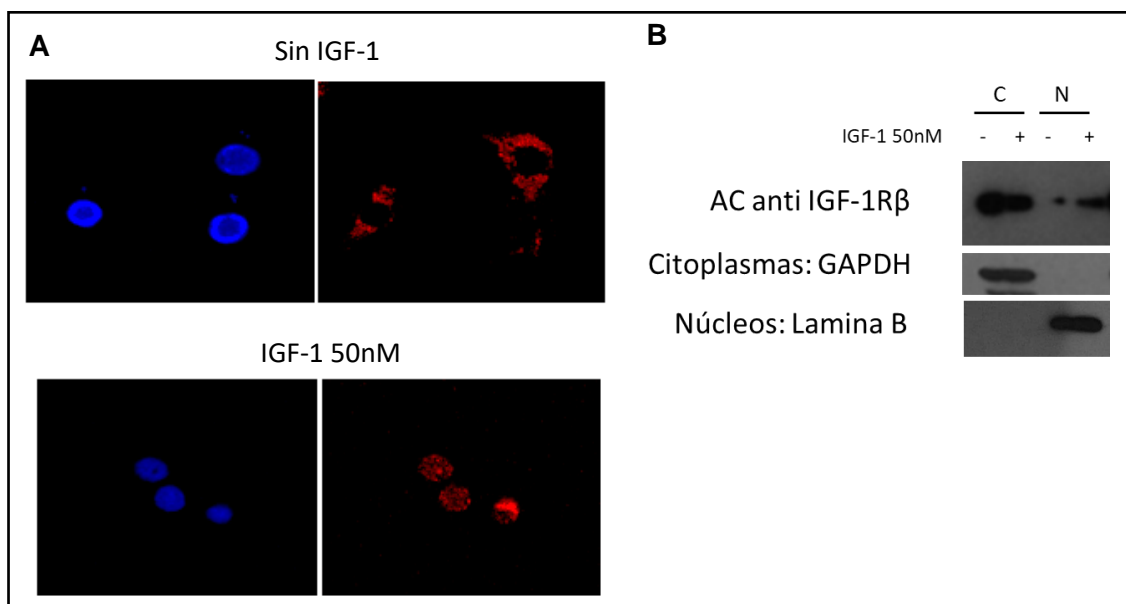
Para continuar con la caracterización funcional de las células U87 se estudió su proliferación y apoptosis en respuesta al estímulo con rhIGF-1. Se cultivaron las células con distintas concentraciones de suero fetal bovino (SFB) para encontrar una condición en la cual las células no aumentaran su proliferación en el tiempo como consecuencia de la presencia en el medio de factores ajenos al estímulo específico (fig 30). Se eligió como condición el cultivo con medio suplementado con 1 % SFB, al cual se le agregó o no rhIGF-1 en una concentración final de 50 nM.



**Figura 30: Efecto del IGF-1 sobre la proliferación y la apoptosis de las células U87.** A) las células U87 fueron cultivadas por 4 días con distintas concentraciones de SFB y en ausencia del mismo para elegir la condición en que las células sobrevivan sin aumentar su proliferación. B-C) Luego de elegir la condición de cultivo con 1% SFB se cultivaron las células en presencia o no de IGF-1 50 nM, para estas condiciones se determinó el número de células por ml (B) y la tasa de apoptosis (C). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  DS.

Como muestra la figura 30, no se registraron diferencias en el número total de células viables en presencia o ausencia del estímulo específico en los tiempos estudiados. Asimismo, luego de 4 días de cultivo en las mismas condiciones, se estudió la apoptosis celular mediante la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio sin que se observen diferencias bajo estímulo con IGF-1. Esto nos permite inferir que la proliferación de estas células no es estimulada por IGF-1 en estas condiciones experimentales (fig 30).

Por último, se buscó comprobar la capacidad de IGF-1R de migrar al núcleo en respuesta a IGF-1 en esta línea celular. Se registró que, en las células en cultivo, luego de 8 h de estímulo con IGF-1 50 nM el IGF-1R es capaz de translocar al núcleo. Este estudio se realizó por microscopía de fluorescencia confocal (fig 31) y fue verificado por fraccionamiento subcelular seguido por *western blotting* (fig 31). Para ambas técnicas se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente la subunidad  $\beta$  del IGF-1R.



**Figura 31: Translocación del IGF-1R al núcleo en respuesta a IGF-1.** Las células en cultivo fueron estimuladas por 8 h con IGF-1 50 nM. A) Luego del estímulo, o no, se realizó una inmunofluorescencia para detectar la localización del IGF-1R, que fue revelada con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (rojo). B) Luego del estímulo se extrajeron las proteínas celulares y se separaron por wb que se reveló con un anticuerpo que reconoce específicamente el IGF-1R. como controles de carga se utilizaron GAPDH para la fracción no nuclear y lámina B para la fracción nuclear.

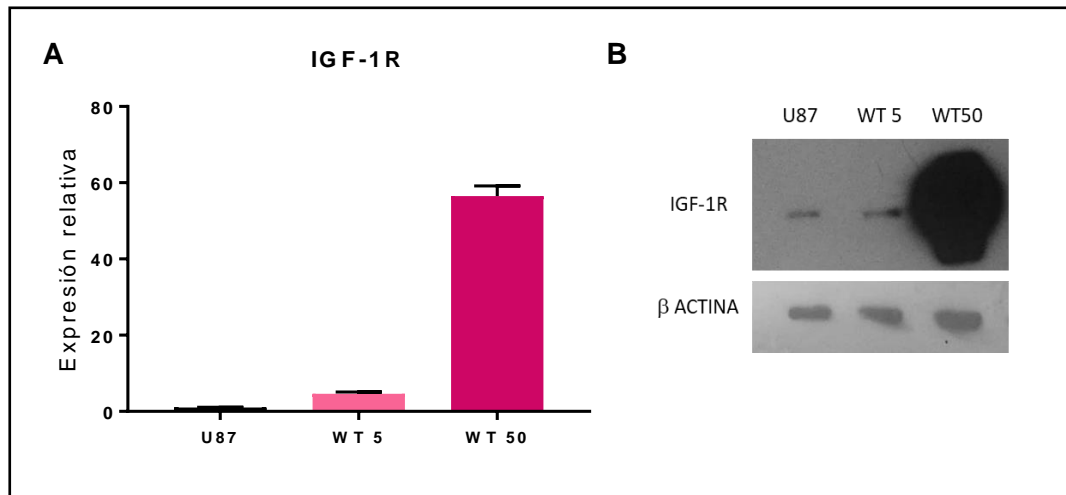
Con estos resultados, podemos confirmar que la línea U87 es un modelo apropiado para caracterizar el impacto de la expresión y localización diferencial del IGF-1R.

#### Obtención y caracterización de líneas con expresión estable del IGF-1R

Para continuar con estudio, se generaron dos modelos para recrear lo observado en los gliomas pediátricos de alto grado. Por un lado, se generaron clones celulares con sobreexpresión del IGF-1R, en los cuales se exacerba el circuito IGF-1/IGF-1R (transfección con el vector IGF-1R-GFP). Por otro lado, se generó por mutagénesis dirigida secuencial el vector conteniendo la secuencia codificante del IGF-1R maduro con las lisinas 1025, 1100 y 1120 mutadas de manera que en esas posiciones se expresen argininas (ver detalles en sección *Establecimiento de líneas celulares con IGF-1R no nuclear*, materiales y métodos) que no pueden ser sumoiladas y como consecuencia el IGF-1R no puede migrar al núcleo en respuesta a IGF-1 (71) (transfección con el vector GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup>).

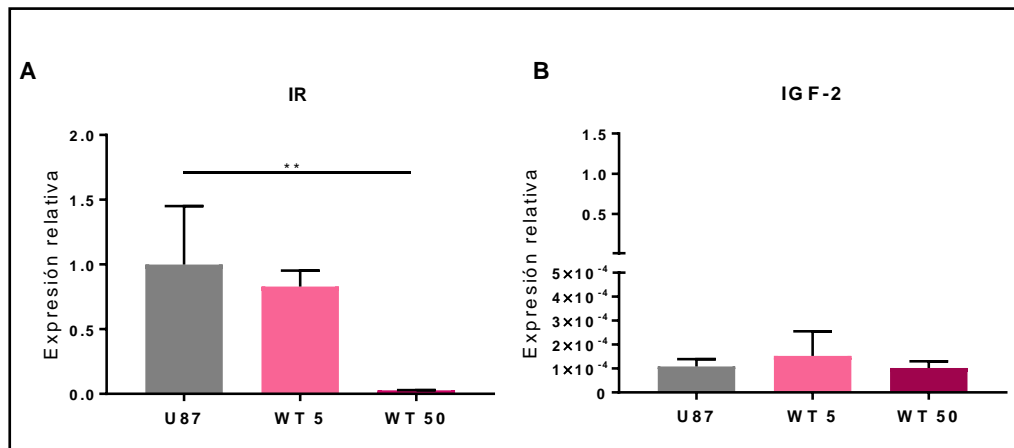
#### *Obtención de líneas con expresión estable de GFP-IGF-1R*

Por PCR en tiempo real se estudiaron los niveles de ARNm del IGF-1R en varios de los clones obtenidos luego de la selección con geneticina (G418). Luego de este estudio se seleccionaron dos clones que, en comparación con la línea parental, sobreexpresan el receptor aproximadamente 5 (clon WT 5) y 50 (clon WT 50) veces respectivamente (fig 32). La mayor expresión fue corroborada a nivel de la proteína, aunque no cuantificada por las limitaciones intrínsecas de la técnica *de western blotting* (fig 31).



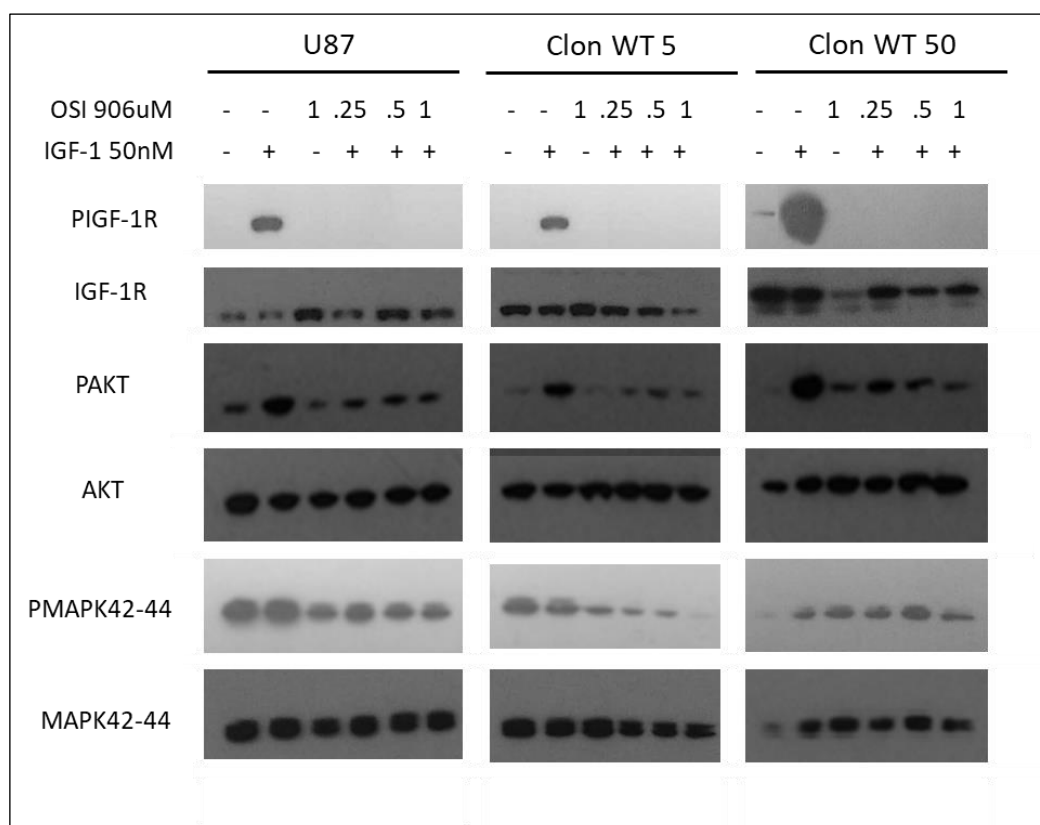
**Figura 32: Sobreexpresión del IGF-1R en clones transfectados con el IGF-1R nativo.** Las células U87 fueron transfectadas con el vector IGF-1R-GFP para obtener clones que sobreexpresen dicho receptor. Se seleccionaron dos clones y se determinó el nivel de expresión del IGF-1R. A) estudio de la expresión de ARNm del IGF-1R a nivel de ARNm por PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados usando curvas de cuantificación relativa y se presentan como veces de cambio en comparación a condiciones control (células U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS. B) Western blot representativo para IGF-1R en extractos de proteínas de células U87 y sus clones. Se utilizó  $\beta$ actina como control de carga.

Seguidamente se estudió la expresión de los demás componentes del sistema de los IGFs en ambas líneas (WT5 y WT50) considerando un posible impacto en la línea parental debido a la sobreexpresión del IGF-1R. Se encontró que ambos clones continúan expresando el IR, pero a diferencia del clon WT 5, para el cual la expresión no varía si se la compara con la línea parental, en el clon WT 50 la expresión del IR se ve disminuida en más de un 90 % (fig 33). En cuanto a los ligandos, no se detectaron variaciones en la expresión de IGF-2 en comparación con la línea parental. Al igual que en esta última, el IGF-1 resultó indetectable en los clones WT 5 y WT 5 (fig 33).



**Figura 33: Expresión de genes del sistema de los IGFs en las clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo.** A) Cuantificación relativa de la expresión de ARNm de IR regularizada a TBP en los clones WT 5 y WT 50 respecto a la expresión del IR en la línea parental U87 transfectada con el vector pEGFP vacío. B) Ídem A, en este caso se grafica la expresión de IGF-2. En ambos casos los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS. (\*\* $p < 0.005$ , ANOVA, post-test de Tukey).

A continuación, se estudiaron las vías de señalización activadas en estos clones en respuesta al IGF-1. Para corroborar que la respuesta observada fuera específica por el estímulo, se utilizó el inhibidor OSI906. Este inhibidor es una molécula pequeña, diseñada para inhibir la fosforilación del IGF-1R y del IR (165). Para determinar la concentración óptima de inhibición, realizamos una curva de dosis respuesta tanto en la línea parental como en los clones seleccionados, utilizando concentraciones de 1, 0,5 y 0,25  $\mu$ M de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Luego de los estímulos se obtuvieron las proteínas celulares que se analizaron por *western blotting*. Solo se observó fosforilación del IGF-1R cuando las células fueron estimuladas con rhIGF-1 sin inhibidor (fig 34) en todas las líneas celulares. La fosforilación de AKT aumenta en respuesta al estímulo con IGF-1, y vuelve a niveles basales cuando las células son preincubadas con OSI906 (fig 34).

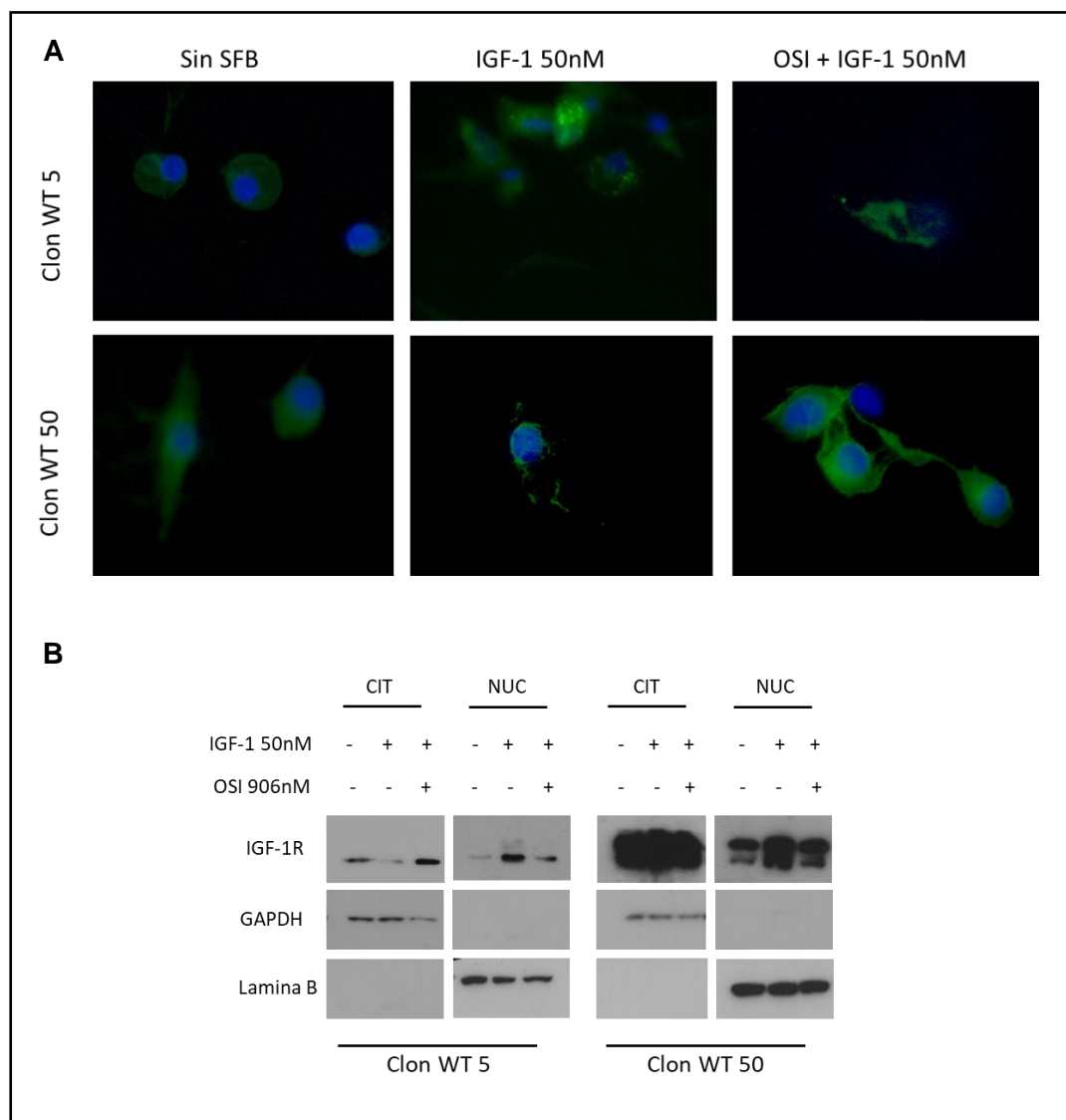


**Figura 34: Activación del IGF-1R y vías de señalización en respuesta al IGF-1 en células U87 y sus clones con sobreexpresión del IGF-1R.** Luego del estímulo de las células por 10 minutos con IGF-1 50 nM, y en los casos que corresponde la preincubación con el inhibidor del IGF-1R, OSI906, se extrajeron las proteínas y se las separó por wb. Las membranas fueron reveladas con los anticuerpos de interés, para evidenciar las siguientes proteínas: IGF-1R, AKT, MAPK P42-44 y MAPK P38 tanto en su forma fosforilada como total.

En cuanto a la respuesta de la MAPK P42-44, se observó que su fosforilación no varía entre las condiciones basales y el estímulo con IGF-1 (fig 34). Sin embargo, cuando las células son preincubadas con el inhibidor del IGF-1R, los niveles de fosforilación de la MAPK caen por debajo de los niveles basales, lo que sugiere una activación constitutiva de esta vía que puede ser inhibida usando OSI906.

Los experimentos antes descriptos fueron utilizados para establecer la concentración de trabajo para el inhibidor dual OSI906, que fue establecida en 0,5  $\mu$ M.





**Figura 35: Translocación del IGF-1R al núcleo en respuesta a IGF-1.** Los clones con sobreexpresión del IGF-1R WT 5 y WT 50 fueron cultivadas sin suero o estimuladas por 8 h con IGF-1 50 nM, con y sin una preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906 (0,5 nM). A) Los clones fueron incubadas con Hoechst (núcleos azules) y analizadas por microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de la proteína de fusión IGF-1R.GFP (verde). B) Se extrajeron las proteínas celulares y se separaron en un wb que se reveló con un anticuerpo que reconoce específicamente el IGF-1R. como controles de carga se utilizaron GAPDH para la fracción no nuclear y lámina B para la fracción nuclear.

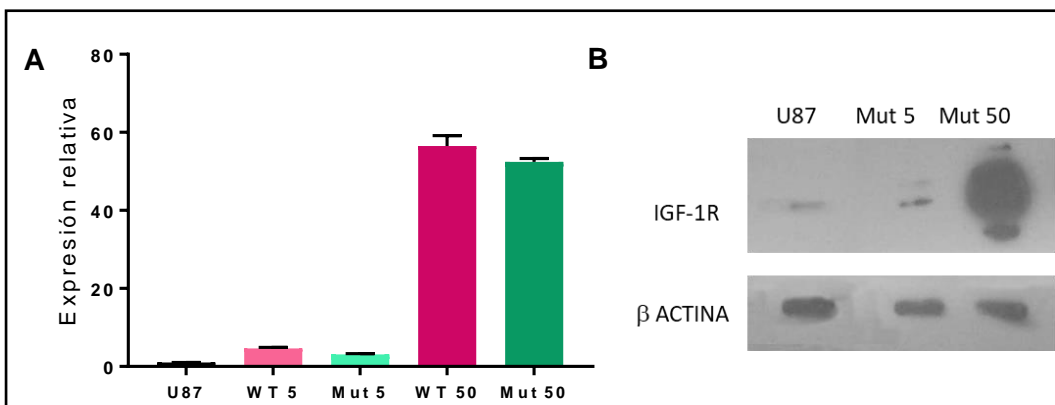
También se estudió en los clones WT 5 y WT 50 la translocación del IGF-1R al núcleo en respuesta al IGF-1. Como se puede observar en la figura 33, luego de 8 h de estímulo con IGF-1 50 nM se evidencia la relocalización del IGF-1R al núcleo celular. Se

comprobó la especificidad de la respuesta al estímulo al quedar bloqueada la migración al núcleo cuando las células son preincubadas con OSI906. El fenómeno de translocación fue verificado por fraccionamiento subcelular y *western blotting* (fig 35).

*Obtención de líneas con expresión estable de GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup>*

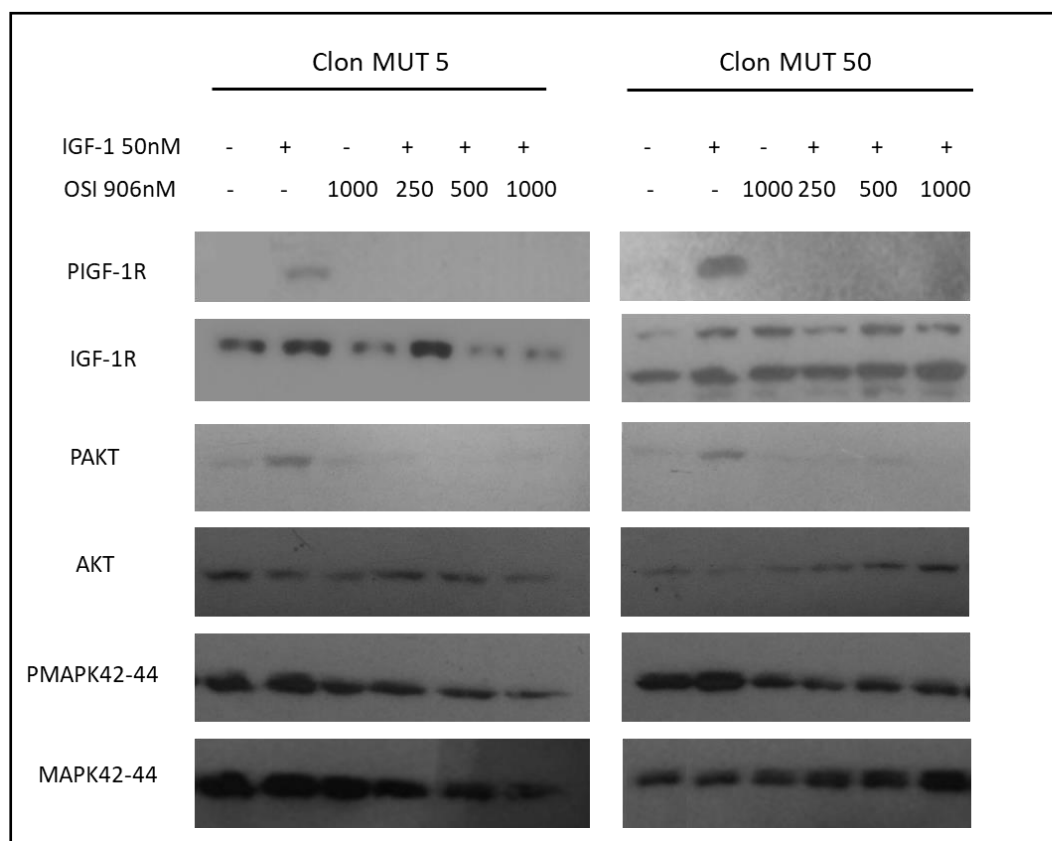
Las líneas celulares fueron generadas luego de la transfección de células U87 con un vector del IGF-1R mutado en 3 lisinas que no permite su SUMOilación. Se ha descripto previamente que esta modificación post-traducciona es condición necesaria para que el receptor pueda migrar al núcleo luego de su activación (71).

Nuevamente, se estudiaron los niveles de ARNm (PCR en tiempo real) y de proteína (WB) del receptor en varios de los clones obtenidos y se seleccionaron dos clones con expresión del IGF-1R mutado comparable con los clones WT 5 e WT 50, a los que se denominó Mut 5 Y Mut 50 (fig 36).



**Figura 36: Sobreexpresión del IGF-1R en clones transfectados con el IGF-1R mutado.** Las células U87 fueron transfectadas con el vector GFP-IGF-1R<sup>1025x-1100x-1120x</sup> para obtener clones que sobreexpresen dicho receptor con la mutación en las lisinas indicadas. Dos clones fueron seleccionados y los niveles de expresión del IGF-1R fueron determinados. A) estudio de la expresión del IGF-1R de ARNm por PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados usando curvas de cuantificación relativa y se presentan como veces de cambio en comparación a condiciones control (células U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío). Se incluyen también las veces de sobreexpresión del IGF-1R en los clones WT 5 y WT 50. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS. B) Western blot representativo para IGF-1R de extractos de proteínas de células U87 y sus clones. Se utilizó  $\beta$ actina como control de carga.

Como ha sido descrito previamente, la mutación en las lisinas 1025,1100 y 1120 por argininas impide que el IGF-1R sea sumoilado, pero no modifica su capacidad de autofosforilación luego del estímulo con IGF-1 (167). En nuestro modelo esto fue comprobado luego del estímulo durante 10 minutos con rhIGF-1 y su especificidad se demostró mediante la preincubación de los cultivos celulares con concentraciones crecientes del inhibidor OSI906 (fig 37).



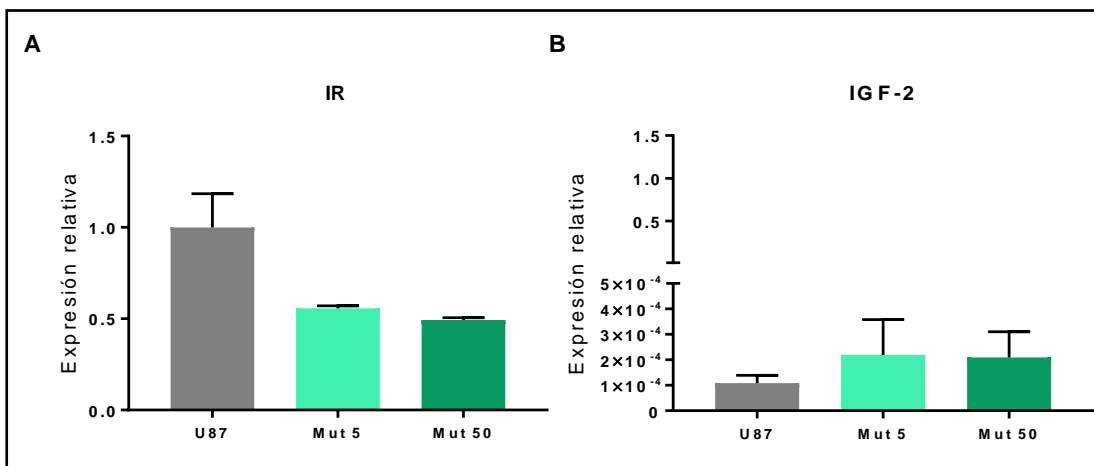
**Figura 37: Activación del IGF-1R y vías de señalización en respuesta al IGF-1 en clones con sobreexpresión del IGF-1R mutado.** Luego del estímulo de las células por 10 minutos con IGF-1 50 nM, y en los casos que corresponde la preincubación con el inhibidor del IGF-1R, OSI906, se extrajeron las proteínas y se las separó por wb. Las membranas fueron reveladas con los anticuerpos de interés, para evidenciar las siguientes proteínas: IGF-1R, AKT, MAPK P42-44 y MAPK P38 tanto en su forma fosforilada como total.

Al igual que en los clones que sobreexpresan el IGF-1R sin mutar, la fosforilación del IGF-1R solo se observa cuando las células son estimuladas con rhIGF-1 sin inhibidor

(fig 37). Al estudiar la fosforilación de AKT, se verifica que la misma aumenta en respuesta al estímulo con IGF-1, y vuelve a niveles basales cuando las células son preincubadas con OSI906 (fig 37).

Nuevamente se observa fosforilación de la vía de MAPK P42-44 en condiciones basales sugiriendo una activación constitutiva de esta vía (fig 37). Sin embargo, cuando las células son preincubadas con el inhibidor del IGF-1R y luego estimuladas con IGF-1, los niveles de fosforilación de MAPK disminuyen, confirmando que en los clones Mut 5 y Mut 50, dicha vía también puede inhibirse mediante el uso del OSI906.

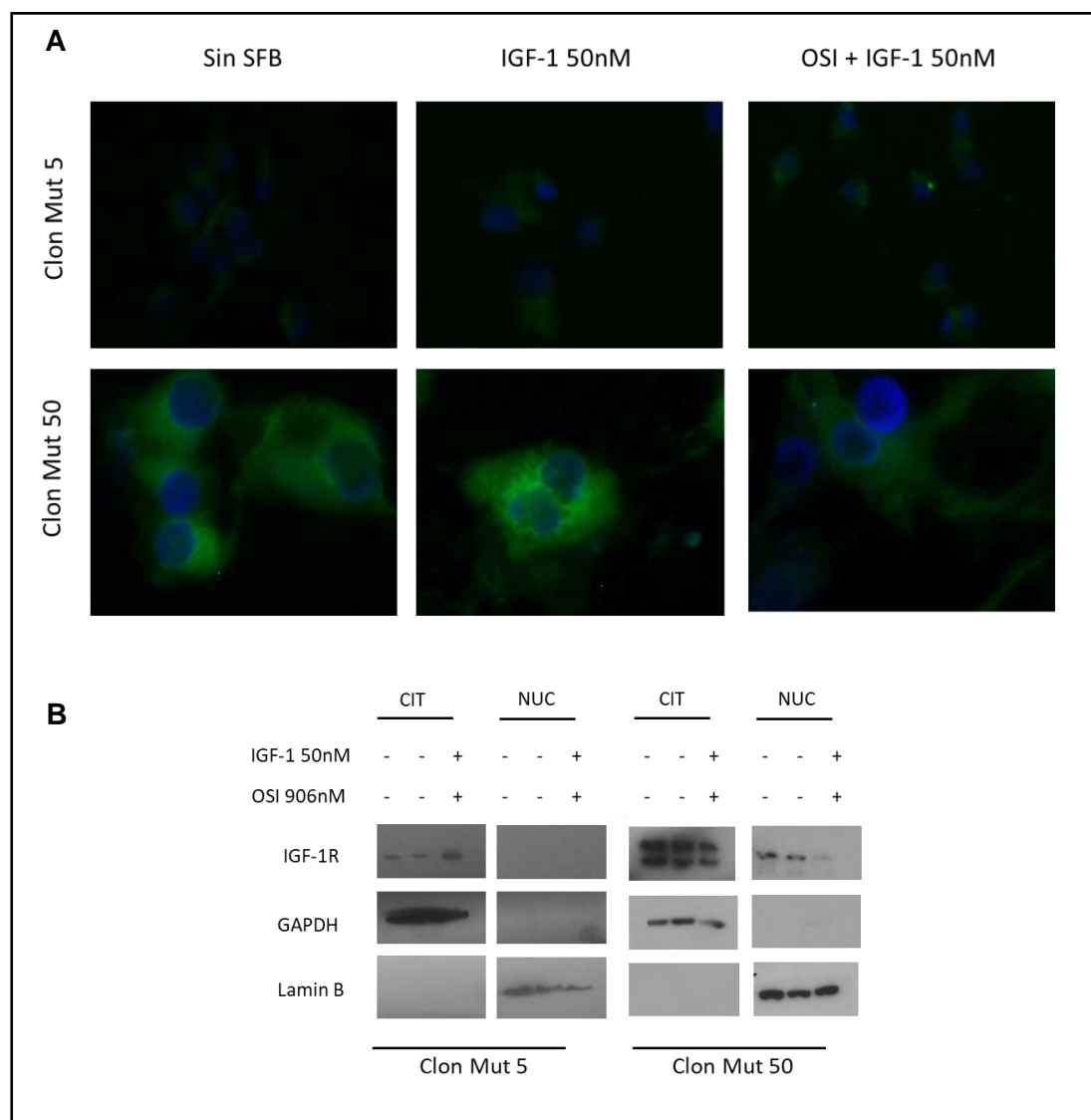
En los clones mutantes también se estudió la expresión del IR y de los ligandos del sistema de los IGFs. Como se muestra en la figura 38, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del IR ni de IGF-2. Al igual que en la línea parental y en los clones WT 5 y WT 50 no se detectó expresión de IGF-1 en los clones con sobreexpresión del IGF-1R mutante.



**Figura 38: Expresión de genes del sistema de los IGFs en las clones con sobreexpresión del IGF-1R mutado.** A) Cuantificación relativa de la expresión a nivel de ARNm de IR regularizada a TBP en los clones Mut 5 y Mut 50 respecto a la expresión del IR en la línea parental U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío. B) Ídem A, en este caso se grafica la expresión de IGF-2. En ambos casos los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS.

Para completar la caracterización de los clones Mut 5 y Mut 50 con el IGF-1R mutado se estudió la capacidad del IGF-1R de migrar al núcleo luego de 8 h de estímulo con

IGF-1 50 nM. En efecto, el receptor mutado no es capaz de migrar al núcleo luego del estímulo como se pudo observar por microscopía de fluorescencia (fig 39). Este resultado fue confirmado mediante fraccionamiento subcelular y posterior análisis de las proteínas en cada fracción mediante la técnica de *western blot* (fig 39).

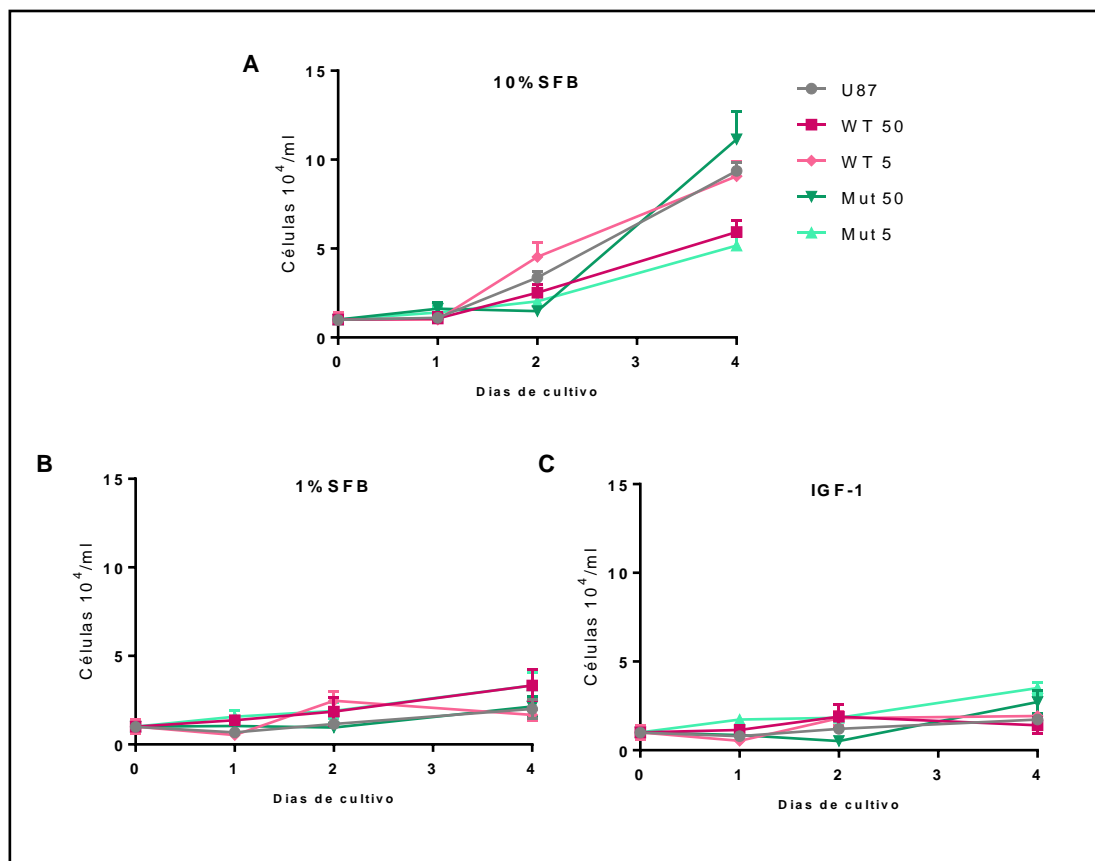


**Figura 39: Efecto de la mutación en las lisinas 1025, 1100 y 1120 en el IGF-1R sobre la translocación del IGF-1R en respuesta a IGF-1.** Las clones Mut 5 y Mut 50 fueron incubadas o no por 8 h con IGF-1 50 nM con y sin una preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906 (0,5 nM). A) Los clones fueron incubadas con Hoechst (núcleos azules) y analizadas por microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de la proteína de fusión IGF-1R.GFP (verde). B) Se extrajeron las proteínas celulares y se separaron en un wb que se reveló con un anticuerpo que reconoce específicamente el IGF-1R. como controles de carga se utilizaron GAPDH para la fracción no nuclear y lámina B para la fracción nuclear.

### Efecto del IGF-1 sobre la proliferación celular y apoptosis

Se estudió el efecto del estímulo con IGF-1 por tiempos prolongados tanto en las líneas WT 5 y WT 50 como en las líneas con el IGF-1R mutado (Mut 5 y Mut 50) en comparación con las células U87 transfectadas con el vector GFP vacío (U87).

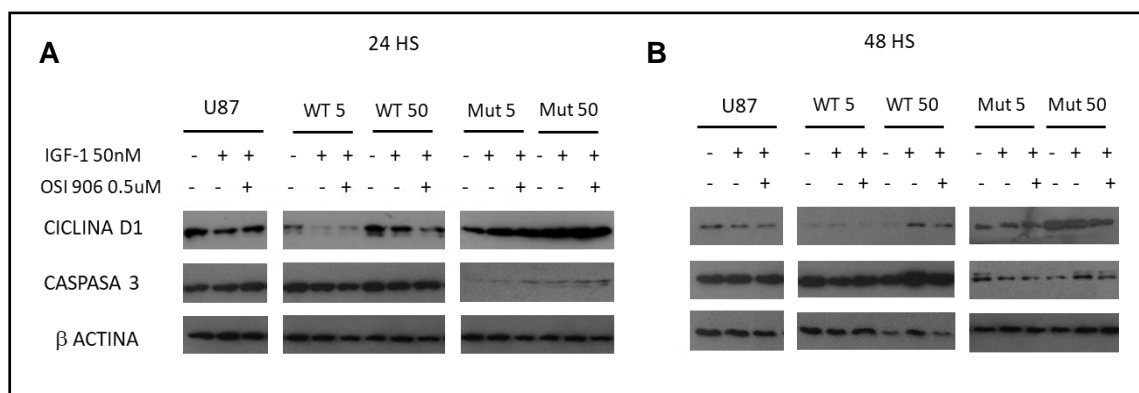
En todos los casos, las células muestran un crecimiento sostenido y comparable cuando son cultivadas en medio de cultivo suplementado con SFB al 10 % (fig 40). Como se puede observar en la figura 40, no hubo aumento de la proliferación celular en respuesta a IGF-1, en la línea parental ni en las líneas WT5, WT50, Mut 5 y Mut 50 si se compara con las células cultivadas con 1 % SFB.



**Figura 40: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la proliferación celular.** Las células U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío, los clones con sobreexpresión del IGF-1R WT 5 y WT 50 y los clones con IGF-1R mutante Mut 5 y Mut 50 fueron cultivados por 4 días con 10 % SFB, o con 1 % SFB en presencia o no de IGF-1. Para estas condiciones se determinó la proliferación de las células U87 (A) Células cultivadas con 10 %SFB (B) Células cultivadas con 1 %SFB + IGF-1 50 nM (C) Células cultivadas con 1 %SFB.

Por otro lado, mediante la técnica de *western blotting* se estudió la expresión de la ciclina D1 y de la caspasa 3 luego de 24 y 48 horas de cultivo en las mismas condiciones en que se midió la proliferación celular. También se estudiaron estas proteínas en células preincubadas con el inhibidor OSI906 para corroborar la especificidad del estímulo en caso de que este existiera.

En concordancia con lo observado anteriormente, en ninguno de los clones se encontraron diferencias significativas en la expresión de la ciclina D1 luego del estímulo de las células con rhIGF-1 (fig 41). Por último, se evaluó el posible efecto del IGF-1 como protector de la apoptosis tanto en la línea parental como en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado. El análisis se realizó mediante el estudio de la caspasa 3 por *western blotting*. En este caso tampoco se encontraron diferencias en ninguno de los clones en cuanto a su expresión cuando las células fueron incubadas con rhIGF-1 (fig 41).



**Figura 41: Expresión de Ciclina D1 y Caspasa 3 en la línea celular U87 y en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado.** Las células fueron incubadas o no por 24 o 48 h con IGF-1 50 nM con y sin una preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906 (0,5 nM). Finalizadas las incubaciones se extrajeron las proteínas celulares y se separaron en un wb que se reveló con anticuerpos que reconoce específicamente la ciclina D1 o la proteína caspasa 3 total. Como control de carga se utilizó β-actina. (A) Células incubadas en las condiciones correspondientes por 24 h (B) Células incubadas en las condiciones correspondientes por 48 h.

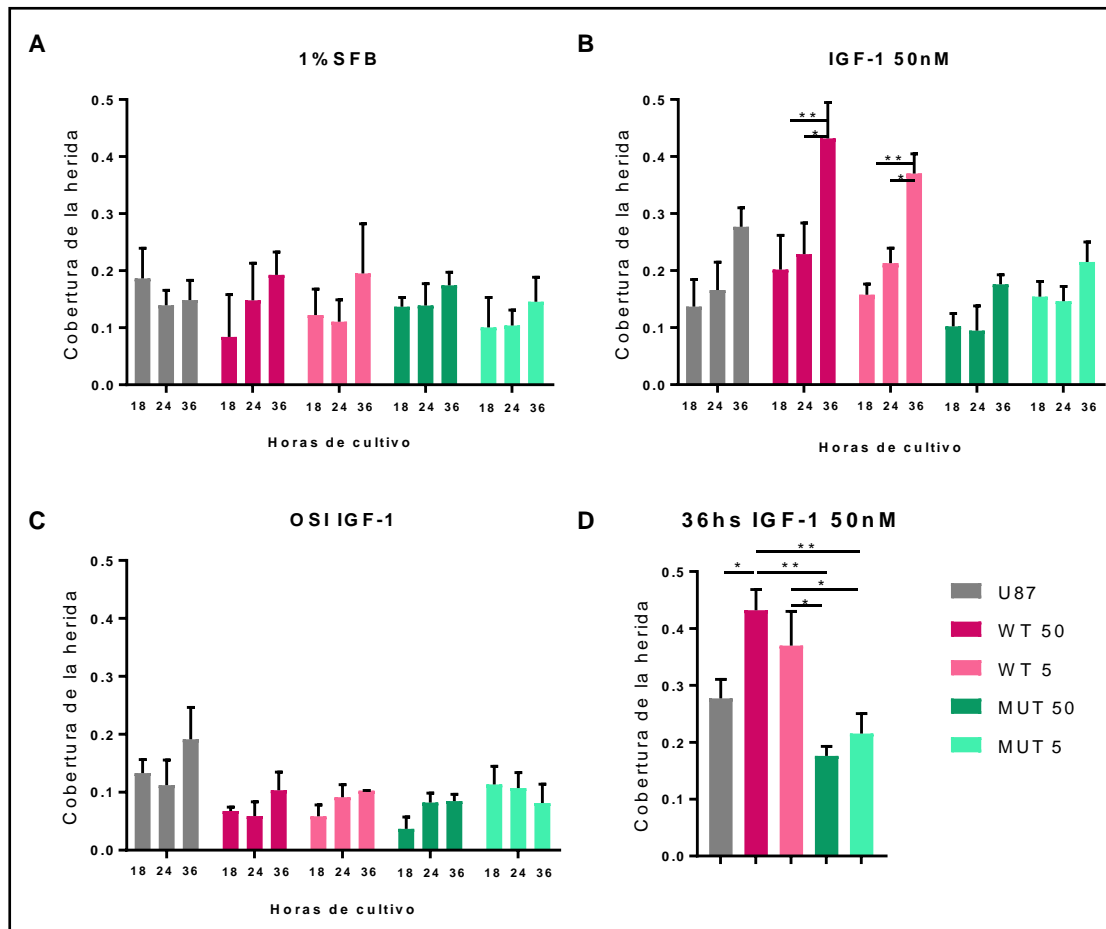
### Efectos del IGF-1 sobre la migración celular

La capacidad de favorecer la motilidad e invasión de las células cancerígenas es otro conocido efecto del sistema de los IGFs (168), por lo cual se estudiaron los posibles efectos sobre la migración tanto en la línea celular parental de glioblastoma, U87 como en los clones generados a partir de estas. Los estudios se realizaron en cultivo mediante ensayos de curación de heridas, con las células cultivadas en condiciones basales, con 1 % de SFB y en presencia de estímulo con 50 nM de IGF-1, por 18, 24 y 36 h de cultivo.

Cuando las células son estimuladas con IGF-1, la migración aumenta y se observa una tendencia al cierre paulatino de la superficie descubierta tanto por parte de la línea parental como para los 4 clones (fig 42). Sin embargo, esta diferencia resulta solamente significativa para los clones que sobreexpresan el IGF-1R sin mutar (WT 50 y WT 5). No se observa migración significativa para los clones Mut 50 y Mut 5 en respuesta a rhIGF-1, lo cual demuestra que el efecto sobre la migración depende de la capacidad del IGF-1R de migrar al núcleo celular y no de la sobreexpresión del receptor en sí mismo. Una vez más se verifica la especificidad de la respuesta al estímulo con IGF-1 en condiciones de inhibición del IGF-1R con OSI906, obteniéndose la superficie descubierta y sin variaciones de la herida en el tiempo (fig 42).

Como se muestra en la figura 42, si se puntualiza el análisis en la respuesta a IGF-1 a las 36hs, único tiempo de los estudiados para el cual la diferencia en la migración fue significativa, y se compara la migración entre los distintos tipos celulares podemos observar que las solo los clones con sobreexpresión del IGF-1R en forma nativa (WT 5 y 50) experimentan mayor migración que las células U87.





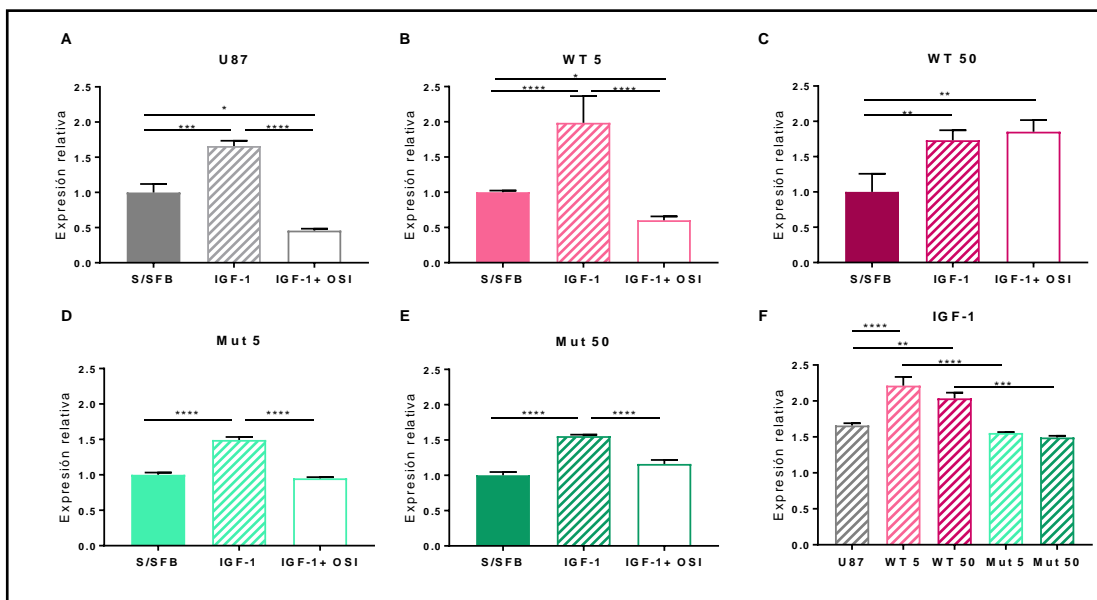
**Figura 42: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la migración celular.** Las células U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío, clones nativos (WT 5 y WT 50) y clones mutantes (Mut 5 y Mut 50) fueron cultivadas y al llegar a confluencia se realizó una herida para evaluar el potencial migratorio. Luego de la herida las células se cultivaron con 1 % SFB, IGF-1 50 nM y preincubación con OSI906 en caso que corresponda. Se tomaron fotos en microscopio óptico a los tiempos 0, 18, 24 y 36 h. Los resultados se presentan como porcentaje de área cubierta en cada tiempo referido a la cobertura en tiempo 0 y se expresan como promedio  $\pm$  DS. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , ANOVA, post-test de Tukey). (A) Células incubadas en medio con 1 % SFB. (B) Células incubadas con IGF-1 50 nM. (C) Células preincubadas con el inhibidor OSI906 0.5  $\mu$ M e incubadas luego con IGF-1 50 nM (D) Comparación de los porcentajes de cobertura de herida para cada tipo celular luego de la incubación por 36 h con IGF-1 50 nM.

### Efectos metabólicos del IGF-1

En las células cancerígenas el sistema de los IGFs tiene importantes efectos favoreciendo el metabolismo celular (84). La principal fuente de energía celular es la

glucosa, que ingresa en las células a través de transportadores específicos como el GLUT1, que se expresa en las células gliales (169).

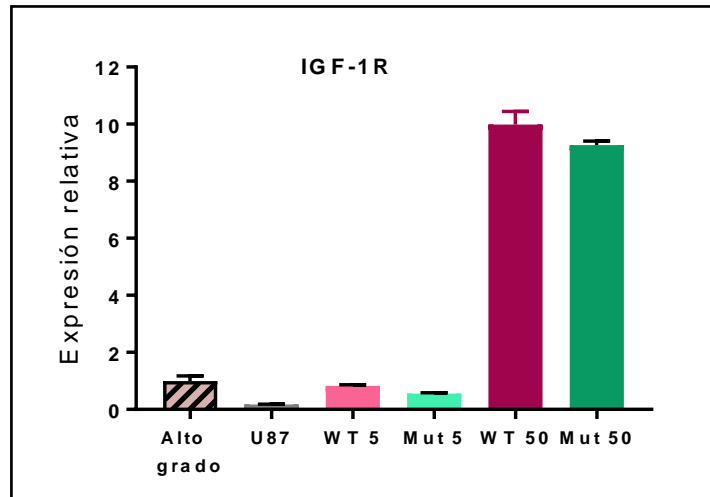
Se verificó en la línea celular U87 la expresión de GLUT1, y se procedió a estudiar los cambios en la expresión de este transportador generados en respuesta al estímulo con IGF-1. Se encontró que tanto en la línea parental como en los clones con sobreexpresión del IGF-1R (mutado o no) el estímulo con IGF-1 50 nM por 24 h aumenta la expresión del GLUT1 (fig 43). Exceptuando el clon WT 50, en todos los casos el aumento de GLUT 1 en respuesta al estímulo se logró revertir al preincubar las células con el inhibidor del IGF-1R OSI906 (fig 43).



**Figura 43: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la expresión del transportador de glucosa GLUT 1.** Las células fueron cultivadas por 24 h con IGF-1 50 nM, con o sin la preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906. Se estudió por PCR en tiempo real la expresión de ARNm de GLUT1 en células U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío (A), en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo (B y C) y en los clones que sobreexpresan el IGF-1R mutado (D y E). F) Resumen de resultados anteriores comparando las líneas celulares tras el estímulo con IGF-1. Los valores fueron calculados usando curvas de cuantificación relativa y se presentan como veces de cambio en comparación a condiciones control (células cultivadas sin suero según corresponda). Los resultados se expresan como promedio ± DS. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  ANOVA, post-test de Tukey).

Por otro lado, si se comparan los niveles de aumento en la expresión del GLUT1 en respuesta a IGF-1, se puede observar un mayor aumento en los clones que sobreexpresan el IGF-1R sin mutar (WT 5 y WT 50) respecto al observado para la línea parental (fig 43). La diferencia antes descrita no se registra entre la línea parental y los clones que sobreexpresan el IGF-1R mutado. Por último, si se comparan los clones con sobreexpresión similar del IGF-1R mutado o no (WT 5 vs Mut 5 y WT 50 vs Mut 50), se observa en ambos casos que la expresión del GLUT1 es mayor en los clones WT, cuando el receptor es capaz de migrar al núcleo luego del estímulo con IGF-1 (fig 43).

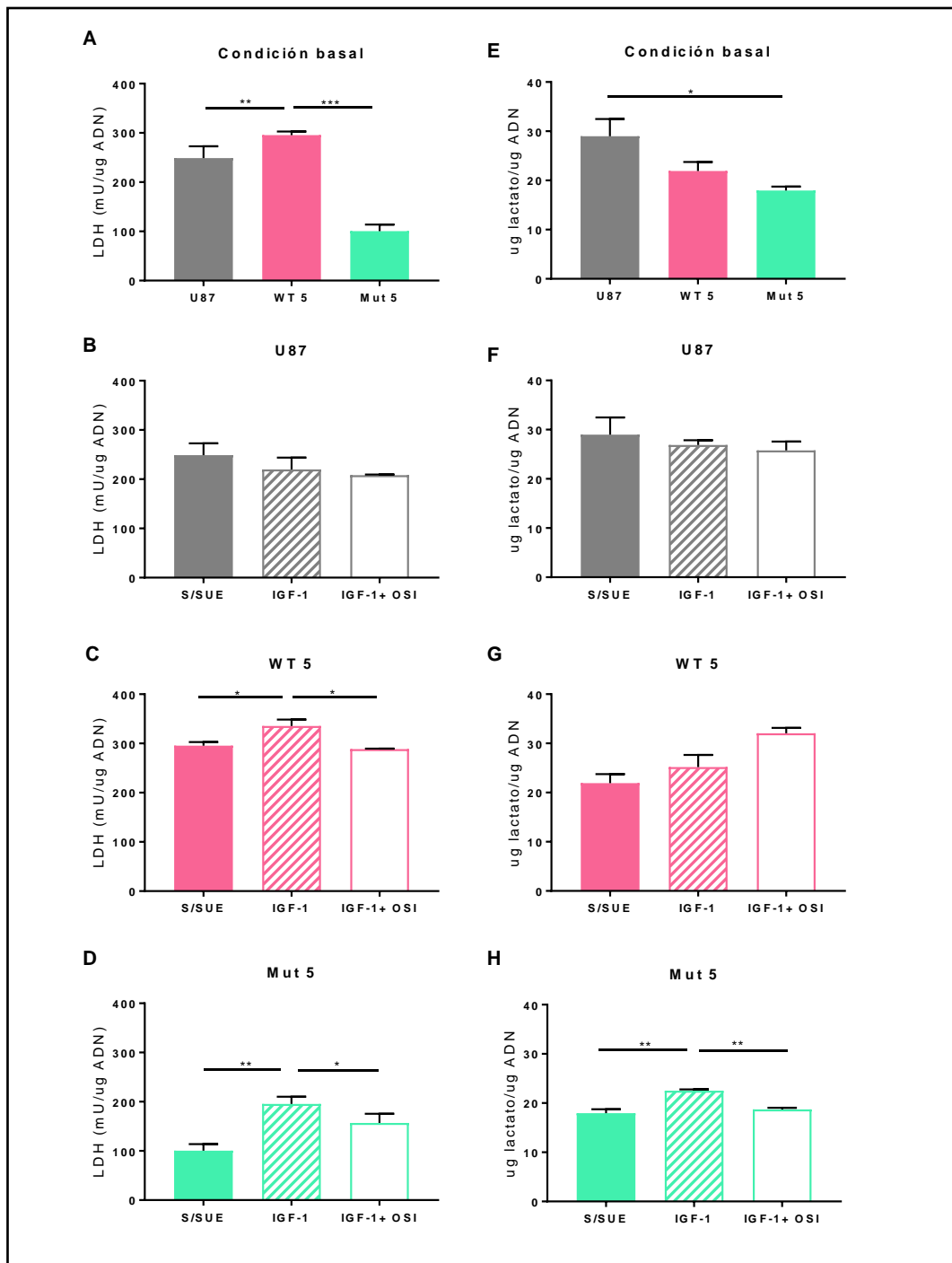
En el estudio molecular realizado en biopsias de gliomas, descrito al principio de este capítulo, no se encontraron variaciones importantes en los niveles de expresión del IGF-1R, es decir, no se registraron tumores en los cuales la sobreexpresión del IGF-1R fuera excesiva respecto de otros. Si se comparan los niveles de expresión del IGF-1R de los glioblastomas pediátricos con los expresados por la línea celular U87 y los clones con 5 o 50 veces de sobreexpresión se puede ver que la que más se asemeja a la de los tumores pediátricos es la registrada en los clones WT 5 y Mut 5 (fig 44). Es por este motivo que se decidió continuar con la caracterización metabólica de los clones con 5 veces de sobreexpresión del IGF-1R mutado o no, para asegurarnos de no estar forzando el sistema con una dosis de receptor que no fuera representativa de las condiciones que se encuentran en los pacientes con glioblastomas.



**Figura 44: Comparación de la expresión de IGF-1R entre glioblastomas pediátricos y modelos celulares.** Estudio de la expresión de ARNm del IGF-1R por PCR en tiempo real en los clones WT 5 y 50 y en los clones Mut 5 y 50. Los valores fueron calculados usando curvas de cuantificación relativa y se presentan como veces de cambio en comparación a los obtenidos para las muestras de glioblastomas pediátricos; en todos los casos los valores de expresión del IGF-1R se encuentran referidos a la expresión de TBP. Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS.

Para estudiar en mayor profundidad si el aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT1 se vería reflejada en un aumento en el metabolismo celular, se estudiaron las dos principales vías metabólicas de la glucosa en las células tumorales para la obtención de energía. Por un lado, se estudió la conversión del piruvato (metabolito final de la glucólisis) a lactato, que ocurre por el proceso de glucólisis aeróbica en un mecanismo caracterizado como efecto Warburg (32). Por otro lado, se focalizó en la conversión de piruvato a acetil-CoA, paso inicial para el metabolismo oxidativo de la glucosa.

Focalizando en el proceso de glucólisis aeróbica se midió tanto la producción de lactato (metabolito final) como la actividad de la enzima responsable de su síntesis, lactato deshidrogenasa (LDH). El estudio se realizó luego de 24 h de estímulo con o sin rhIGF-1 y su especificidad fue constatada mediante el uso del inhibidor dual OSI906.



**Figura 45: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la actividad enzimática de la LDH y la producción de lactato.** Las células fueron cultivadas por 24 h en ausencia de SFB y con IGF-1 50 nM, con o sin la preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906. Se estudió la actividad enzimática de LDH y la producción de lactato en todos los tipos celulares en condiciones basales (A y E), y luego del estímulo con IGF-1 en la línea U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío (B y F), en un clon con sobreexpresión del IGF-1R nativo, WT 5 (C y G) y en los clones que sobreexpresan el IGF-1R mutado (D y H). Los resultados de expresan como promedio  $\pm$  DS. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA, post- test de Tukey).

Como se puede observar en la figura 44 la actividad basal de LDH se encontró reducida en el clon Mut 5 respecto tanto de la línea parental como del clon WT 5. Cuando las células son estimuladas con IGF-1, la actividad de LDH aumenta tanto para el clon que sobreexpresa el IGF-1R sin mutaciones (clon WT5) como para el que expresa el receptor mutado (clon Mut 5), teniendo este último un aumento significativamente mayor en relación al basal (fig 45).

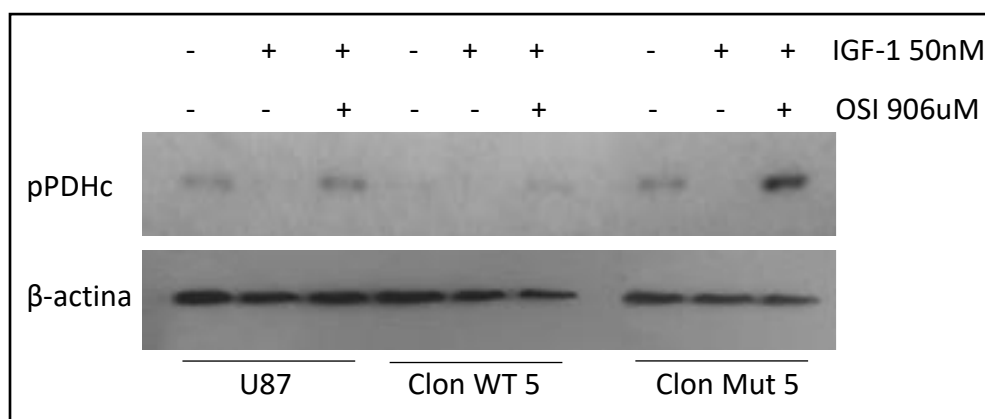
En cuanto a la producción de lactato, se encontró una tendencia de disminución para los clones WT 5 y Mut 5 en relación con el basal, siendo esta diferencia significativa en el clon con sobreexpresión del IGF-1R mutado. No se registraron variaciones en la línea parental tras el estímulo con rhIGF-1 por lo cual la inhibición del IGF-1R con OSI906 tampoco muestra diferencias (fig 45). Al comparar la condición basal con la estimulada con IGF-1, se observó una tendencia al aumento tanto para el clon WT 5 como Mut 5, siendo solo significativa para el clon con sobreexpresión del IGF-1R mutante (fig 45).

En segundo lugar, para estudiar la entrada de glucosa a la vía oxidativa se estudió la conversión del piruvato en acetil-CoA, proceso llevado a cabo por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc). La actividad del PDHc está regulada mediante su fosforilación, por parte de las piruvato dehidrogenasa quinasas (PDKs), y su desfosforilación mediada por las piruvato deshidrogenasa fosfatasas (PDPs), encontrándose activa en su estado desfosforilado. Se evaluó el estado de fosforilación del PDHc luego de 24 h con o sin rhIGF-1 y se encontró que, en todos los casos, la fosforilación de la enzima disminuye luego del estímulo respecto a las condiciones basales. La especificidad de la respuesta a IGF-1 se corroboró con la utilización del inhibidor OSI906 que devuelve a la enzima a un estado de mayor fosforilación, comparable al basal (fig 46).

Por otro lado, se observa que, en todas las condiciones de cultivo la fosforilación del PDHc en el clon WT 5 es menor que la observada para la línea parental y el clon

Mut 5. Esto estaría haciendo referencia a un complejo enzimático basalmente más activado en el clon WT 5 y por consiguiente un mayor flujo de piruvato hacia la vía oxidativa.

Por último, en el caso del clon con el IGF-1R mutado, Mut 5, se observa que aun tras el estímulo con IGF-1 la fosforilación del PDHc no disminuye significativamente respecto de las condiciones basales (fig 46). Esto permitiría asumir que la capacidad del IGF-1R de migrar al núcleo resulta necesaria para que el complejo se encuentre menos fosforilado, y en consecuencia más activo.

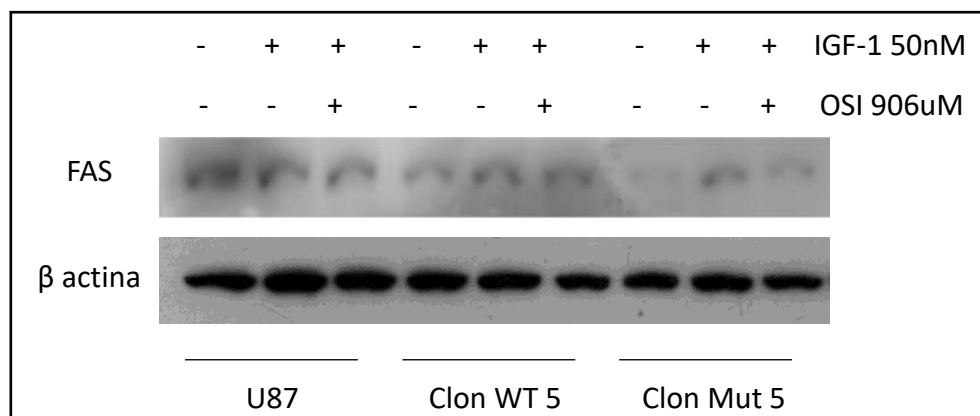


**Figura 46: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la activación del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc):** Las células fueron cultivadas por 24 h con IGF-1 50 nM, con o sin la preincubación con el inhibidor del IGF-1R OSI906. Se extrajeron las proteínas y se analizó por WB el estado de fosforilación del PDHc. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

Como ya fue descrito en la introducción, la vía oxidativa de la glucosa resulta muy importante en varios tipos de cáncer, entre ellos el glioblastoma ya que permite que varios intermediarios del ciclo de Krebs sean derivados hacia vías anabólicas (170). Es por esto que en el presente trabajo se puso foco en el estudio de dos procesos de síntesis de macromoléculas como son los lípidos y las proteínas.

Por un lado, tanto en la línea parental U87 como en los clones WT 5 y Mut 5 se estudió la expresión de la enzima ácido graso sintasa (FAS), encargada de catalizar la síntesis

de ácido palmítico a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. Si bien la proteína se pudo detectar en todos los casos, su expresión resultó menor en el clon con sobreexpresión del IGF-1R mutante, Mut 5 (fig 47). Se observaron variaciones sutiles en la expresión de la FAS entre los clones con sobreexpresión del IGF-1R mutado o nativo. cuando las células fueron tratadas con rhIGF-1.

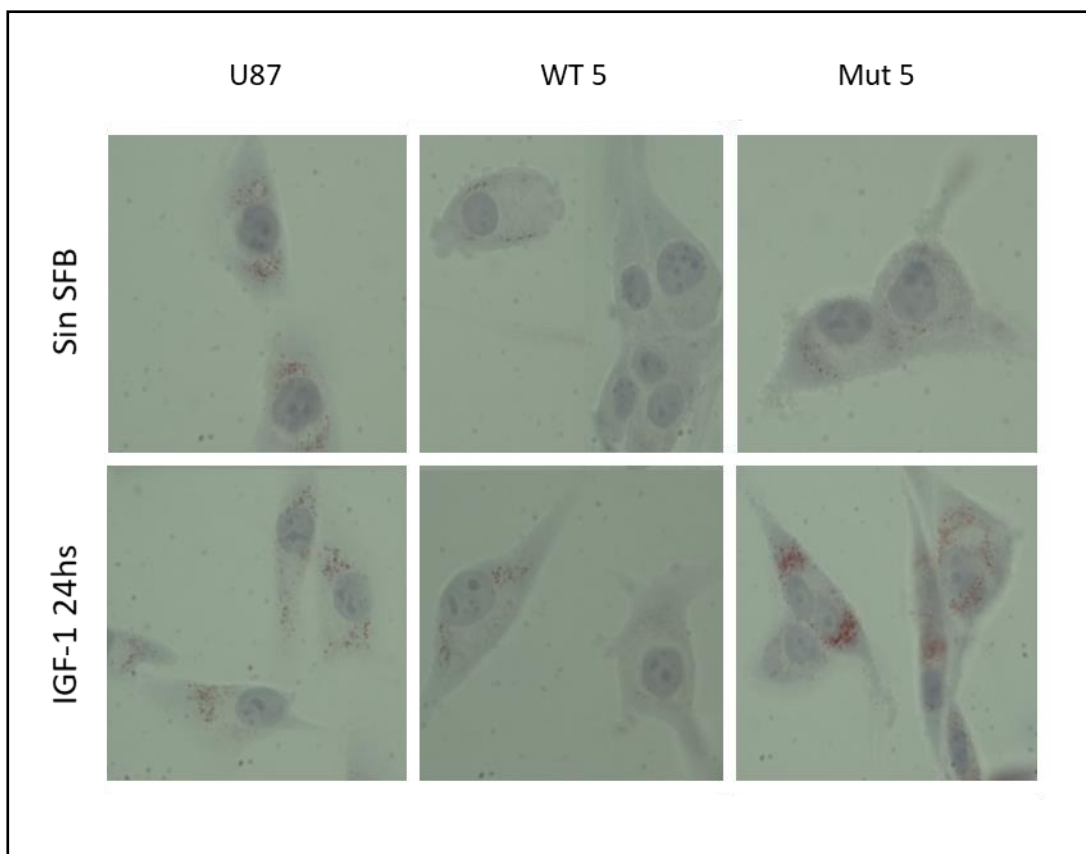


**Figura 47: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la activación de la enzima ácido graso sintasa (FAS):** Las células fueron cultivadas por 24 h con IGF-1 50 nM, con o sin la preincubación del inhibidor del IGF-1R OSI906. Finalizada la incubación se extrajeron las proteínas que fueron analizadas por WB. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

Ha sido descripto previamente que las células de glioma utilizan ácidos grasos como sustrato principal para la obtención de energía (171). El ciclo de Krebs puede aportar intermediarios que son utilizados para la síntesis de ácidos grasos, los cuales pueden luego ser oxidados para obtener energía (118). En los casos en que el metabolismo celular está disminuido, como por ejemplo en casos de hipoxia, los ácidos grasos se acumulan formando gotas de lípidos para luego, poder ser utilizados en condiciones favorables de crecimiento celular (172). Teniendo esto en cuenta, se midió la producción de gotas de lípidos en la línea parental U87 y en los clones luego de 24 h de estímulo con rhIGF-1. Como se observa en la figura 48 la presencia de gotas de lípidos es mayor en el clon con expresión del IGF-1R mutado, detectándose menos



cantidad en la línea parental hasta casi ser inexistente en el clon WT 5. En todos los casos la cantidad de gotas de lípidos se ve aumentada luego del estímulo con IGF-1 (fig 48). Lo descrito anteriormente podría ser indicativo de un metabolismo más aletargado en los clones con el IGF-1R mutante, que almacenan los ácidos grasos sintetizados ya que no necesitan utilizarlos para obtener energía.

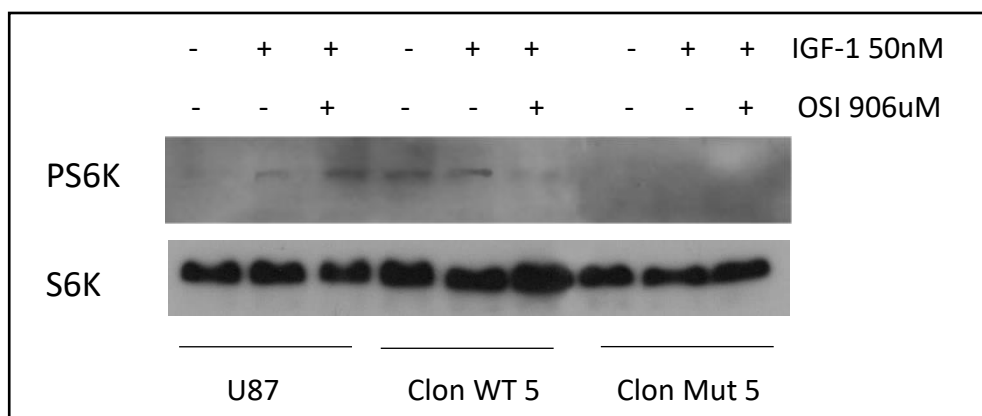


**Figura 48: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre la acumulación de lípidos.** Las células fueron incubadas o no por 24 h con IGF-1 5 0nM. Finalizadas las incubaciones se fijaron las células y se tiñeron con una solución de Oil Red y contracoloración con hematoxilina. Las imágenes fueron obtenidas usando un aumento de 100x con inmersión.

Por otro lado, se estudió el efecto del estímulo con IGF-1 en el proceso anabólico de síntesis de proteínas. Se sabe que la proteína mTOR es una serina treonina quinasa parte de un complejo encargado de integrar diversas señales para regular múltiples

funciones celulares tales como la transcripción, traducción, recambio de proteínas y crecimiento celular entre otras (173). Para evaluar el estado de activación del complejo mTORc, se estudió el estado de fosforilación de uno de sus targets directos, la proteína S6K, en condiciones basales o luego del estímulo con IGF-1 por 24 h. Se encontró un estado fosforilado de S6K, tanto en condiciones basales como luego del estímulo con rhIGF-1, para la línea parental U87 como para el clon que sobreexpresa el IGF-1R (WT 5), siendo en este último mayor. (fig 49).

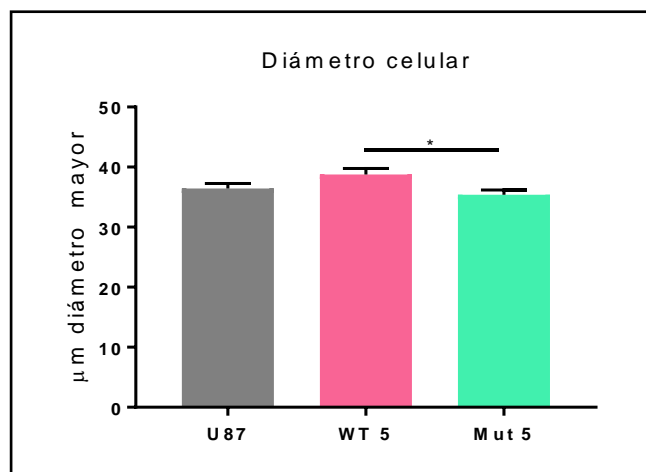
Cabe destacar que no se logró detectar la proteína S6K fosforilada en el clon Mut 5 bajo ninguna de las condiciones estudiadas, lo cual podría estar poniendo de manifiesto la necesidad del IGF-1R de migrar al núcleo celular para activar al complejo mTORc y favorecer así la síntesis proteica.



**Figura 49: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado en las células U87 sobre la activación del complejo mTORC 1.** Las células fueron cultivadas por 24 h con IGF-1 50 nM, con o sin la preincubación del inhibidor del IGF-1R OSI906. Se extrajeron las proteínas y se analizó por WB el estado de fosforilación de la proteína S6K, uno de los principales sustratos de fosforilación del complejo mTORC1. La proteína S6K total fue utilizada como control de carga.

En último lugar, para ver si las diferencias metabólicas encontradas entre los clones WT 5 y Mut 5 tenían impacto sobre el crecimiento celular, se midió el diámetro mayor de un número significativo de células en las diferentes líneas y se calculó su media. Se

encontró que, en condiciones basales, si se comparan las células WT 5 con las Mut 5, las primeras tienen un tamaño mayor, indicando que la capacidad del IGF-1R de migrar al núcleo determina procesos que repercutirían en el tamaño celular (fig 58).



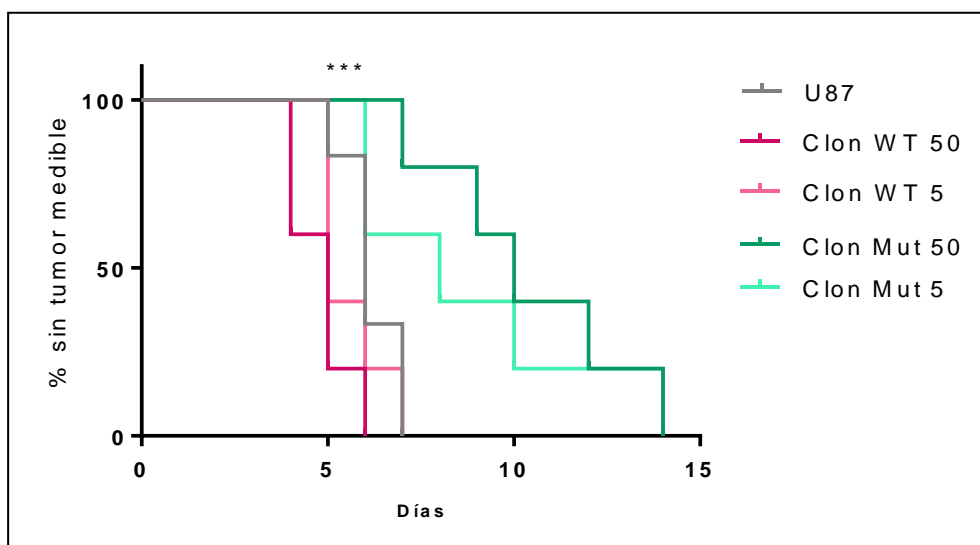
**Figura 50: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y en las células U87 sobre el tamaño celular.** Se midió el diámetro mayor de al menos 300 células cultivadas en condiciones basales utilizando el programa NIS-Elements BR (Nikon). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS. (\* $p < 0.05$ , ANOVA, post-test de Tukey).

### **Estudios in vivo**

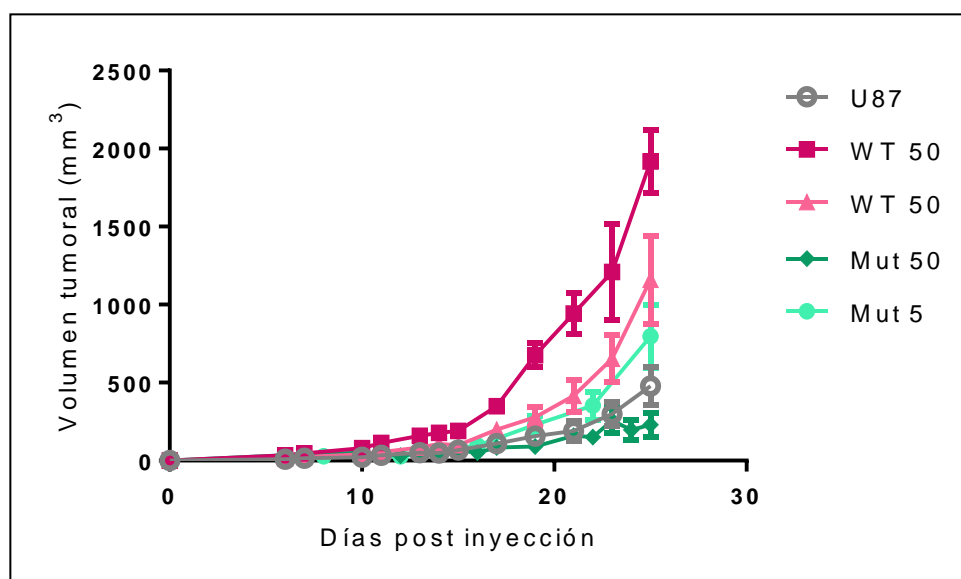
Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del IGF-1R en las células de glioblastoma en un contexto más cercano al fisiológico se realizó un modelo de xenotransplante mediante la inyección subcutánea de células de glioblastoma humano en ratones macho inmunodeficientes (N:NIH (S)- *Fox 1<sup>nu</sup>*). Los ratones fueron inyectados con la misma cantidad de células de la línea U87 transfectadas con el vector pEGFP vacío, de los clones con sobreexpresión del IGF-1R en su forma nativa (clones WT 5 y Wt 50), o de los clones que sobreexpresan el IGF-1R mutado (clones Mut 5 y Mut 50).

Los ratones fueron monitoreados para detectar la aparición tumoral a partir del día 3 post inyección. En la figura 51 se representa el porcentaje de ratones sin tumor medible desde el día de la inyección. El período de latencia hasta la aparición de tumores medibles en un 50 % del grupo experimental fue significativamente más corto para los ratones inyectados con los clones que sobreexpresan el IGF-1R (clones WT 5 y WT 50) que para los inyectados con la línea parental U87 (5 vs 6 días). En contraposición, el periodo de latencia fue mayor para los tumores generados por la inyección de los clones Mut 5 y Mut 50 (8 y 10 días respectivamente).

Los tumores fueron medidos diariamente lo que permitió la construcción de las curvas de crecimiento tumoral. Se puede observar que los tumores generados a partir de la inyección de los clones que clones WT 5 y WT 50 crecen más rápidamente que los generados por la línea U87 o por los clones con el IGF-1R mutado (Mut 5 y Mut 50) (fig 52).

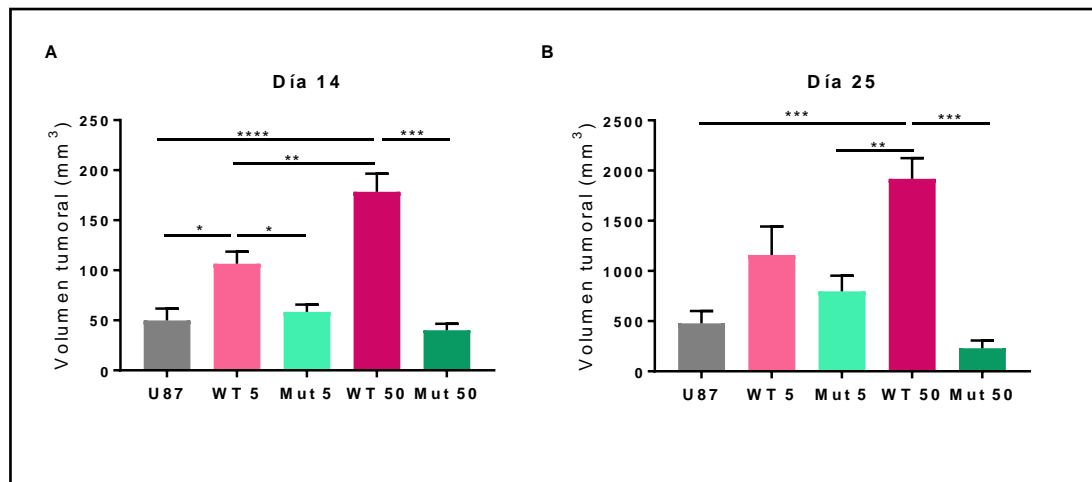


**Figura 51: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado sobre la tumorigénesis.** Las curvas se realizaron considerando el día de aparición de un tumor palpable (\*\* $p < 0.0001$ , Prueba de Log-Rank WT 5vs Mut5 y WT 50 vs Mut 50).



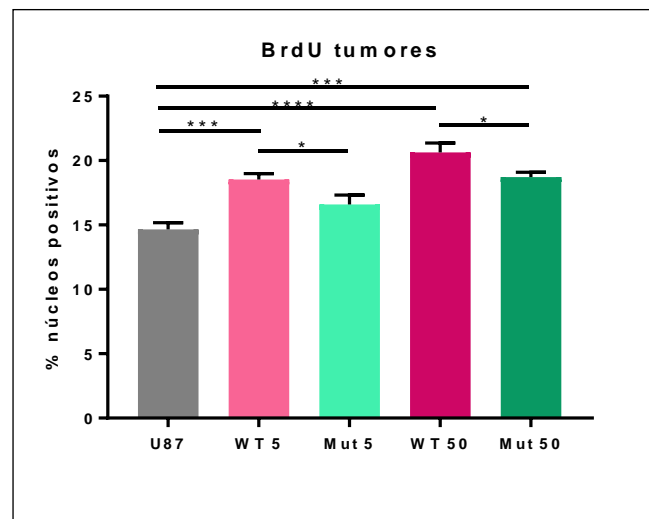
**Figura 52: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado sobre el crecimiento tumoral.** El volumen tumoral fue calculado en base a las mediciones de los diámetros mayor y menor realizadas con calibre diariamente (diámetro mayor  $\times$  diámetro menor<sup>2</sup>). Se muestran las curvas de crecimiento tumoral para todos los tipos celulares analizados. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

Si se comparan los volúmenes tumorales al día 14 post inyección se puede observar con mayor detalle la diferencia en los tamaños según la línea celular que dio origen a los tumores (fig 53). Los tumores que expresan el IGF-1R que puede migrar al núcleo son significativamente más grandes que los generados por la línea parental. A su vez, si se comparan los clones con sobreexpresión similar del IGF-1R nativo y mutado (clon WT 5 vs Mut 5 y clon WT 50 vs Mut 50), una vez más resultan de tamaño mayor los generados por clones cuyo IGF-1R tiene la capacidad de sumoizarse y entrar en el núcleo celular, descartando un posible efecto de dosis de expresión del IGF-1R. En la figura 53 se muestran comparativamente los tamaños tumorales finales (25 días post inyección) para cada uno de los grupos, denotando que la diferencia entre grupos se mantiene hasta el final.



**Figura 53: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado sobre el volumen tumoral.** El volumen tumoral fue calculado en base a las mediciones de los diámetros mayor y menor realizadas con calibre (diámetro mayor  $\times$  diámetro menor<sup>2</sup>). A) Volúmenes tumorales a los 14 días post inyección. B) Volúmenes tumorales a los 25 días post inyección, al momento del sacrificio de los animales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DS. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  ANOVA, post- test de Tukey).

En todos los casos el punto final del experimento fue el día 25 post-inyección y 3 horas antes del sacrificio, los ratones fueron inyectados con una solución de BrdU, como fue descrito anteriormente (107) para calcular el índice de proliferación celular (proporción de células que incorporan el análogo de base marcado respecto del total). Como se puede observar en la figura 54 la proliferación celular es mayor en los tumores generados tras la inyección de los clones WT 50 y WT 5, respecto de la línea parental y los clones mutantes. Esto está en concordancia con las diferencias en los tamaños tumorales registrados (fig 53).



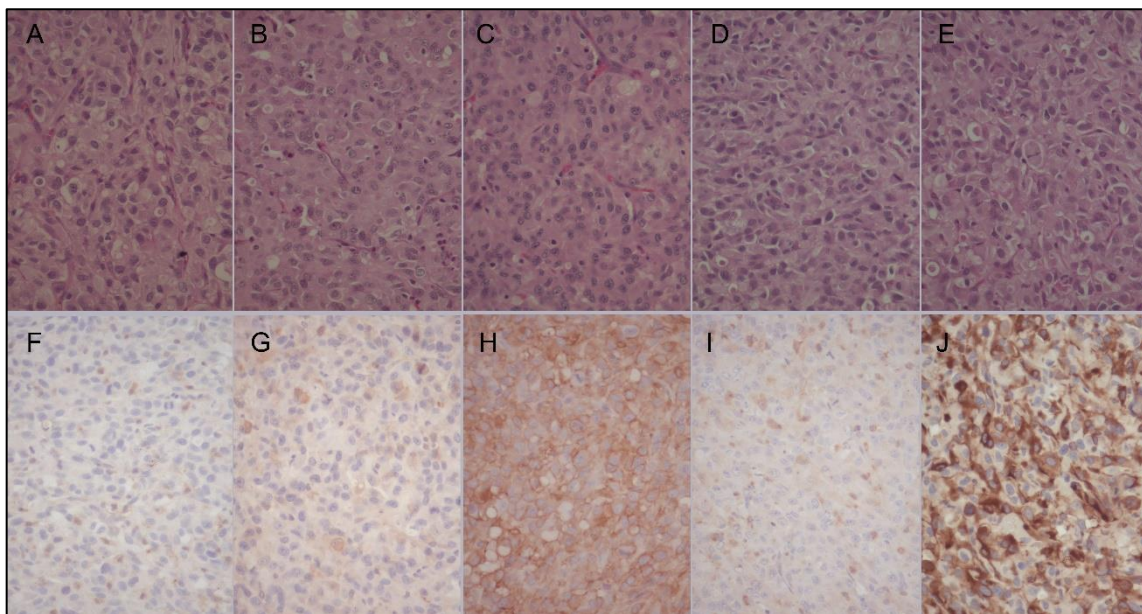
**Figura 54: Efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado sobre la proliferación celular en los tumores.** Tres horas antes del sacrificio, se inyectó a los ratones una solución de BrdU por vía intraperitoneal y posteriormente se disecaron los tumores para la realización de la inmunohistoquímica. Se procesaron tumores y se contaron al menos 4000 células (núcleos) por tumor. Los resultados se expresan como proporción de células (núcleos) positivas sobre el total y se grafican como media  $\pm$  DS. (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  ANOVA, post-test de Tukey).

### Características histológicas de los tumores

El análisis histológico realizado mediante la tinción topográfica de hematoxilina-eosina muestra que los tumores desarrollados son sólidos y compuestos por células poliédricas

con citoplasma amplio, eosinófilo con núcleos redondeados u ovals con cromatina laxa con más de un nucléolo notable. En forma focal se distinguen células con el núcleo excéntrico similares a las células gigantes de los glioblastomas multiformes que se desarrollan en humanos (fig 55, A-E).

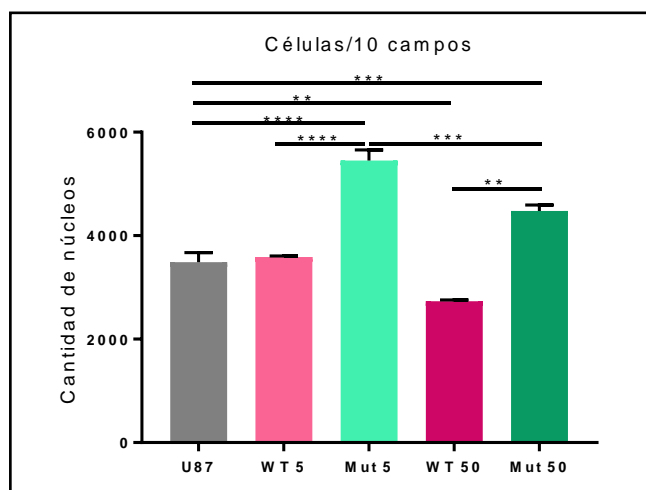
Se realizó el estudio por IHQ para evaluar la presencia del IGF-1R, que pudo ser detectada en todos los casos (fig 55). En general la expresión del IGF-1R fue citoplasmática y difusa, distinguiéndose focalmente algunos núcleos positivos. La marca del revelado con DAB deja de manifiesto las diferencias en expresión del IGF-1R, pudiéndose observar más intensidad en los clones con mayor sobreexpresión del IGF-1R (WT 50 y Mut 50, paneles H y J), intensidad intermedia en los clones con menos sobreexpresión (WT 5 y Mut 5, G e I) y expresión más leve en los tumores generados por la línea parental U87 (panel F).



**Figura 55: H&E e inmunomarcación para IGF-1R.** Los tumores desarrollados en los ratones por todos los tipos celulares mostraron características histológicas similares de acuerdo a la coloración de H-E (A-E). Estudio por IHQ para detectar la expresión del IGF-1R (F-J). Línea parental U87 paneles A y F, clon WT 5 paneles B y G, clon WT 50 paneles C y H, clon Mut 5 paneles D e I, clon Mut 50 paneles E y J. (Aumento: 40x).

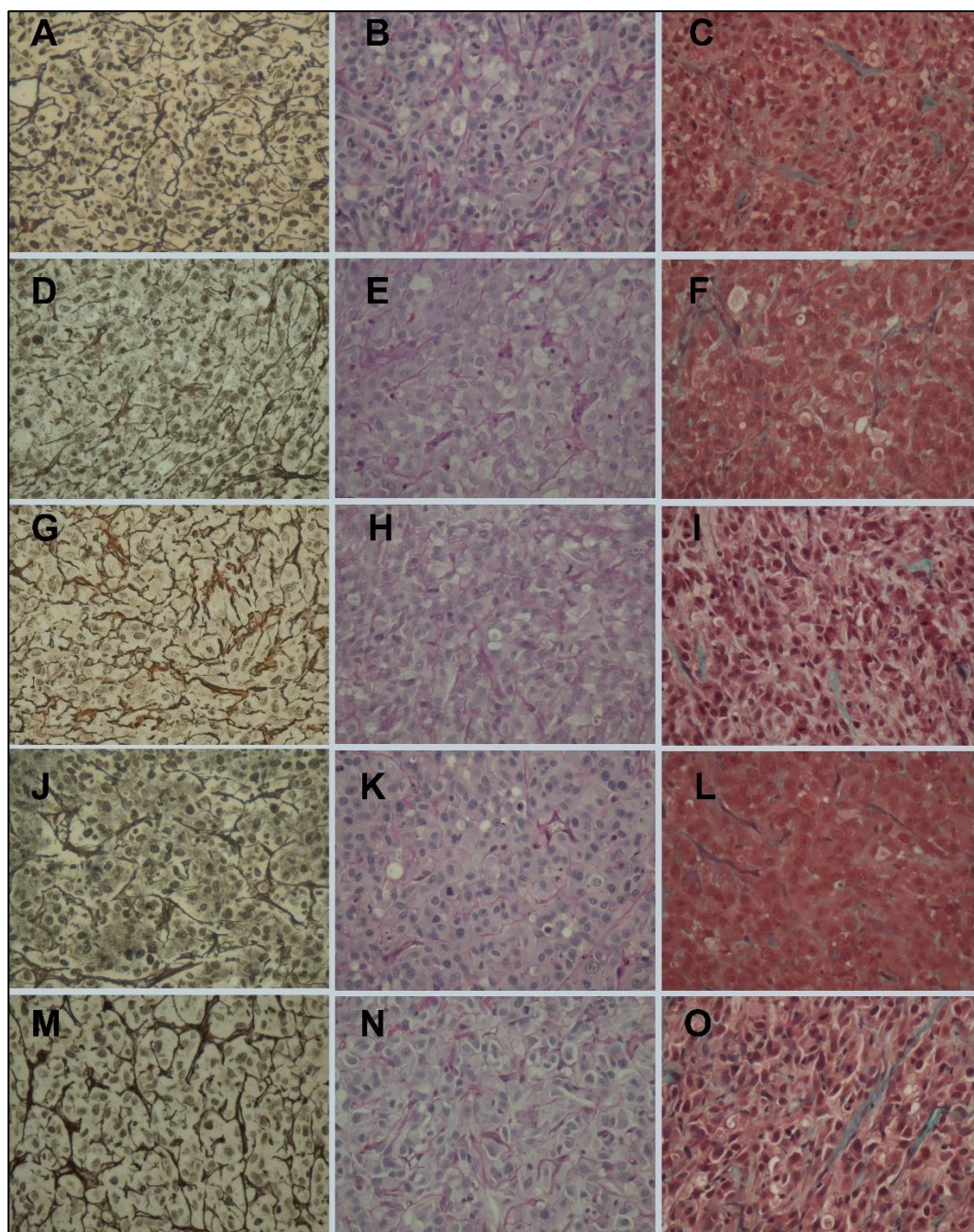


Por otro lado, realizo una evaluación preliminar de la cantidad de células por 10 campos en los tumores generados por las distintas líneas inyectadas. Este estudio piloto se realizó por conteo de núcleos en igual número de campos histológicamente similares para cada tumor utilizando el objetivo de 20x. Como se puede observar en la figura 56, los tumores generados por el clon WT 50 presentan menor cantidad de células en comparación a los generados por el resto de las líneas celulares. Por otro lado, los tumores generados por los mutantes (Mut 5 y Mut 50) son los que presentan mayor número de células, siendo esta diferencia significativamente mayor para los tumores provenientes con menor sobreexpresión del IGF-1R mutado (Mut5).



**Figura 56: Estudio piloto del efecto de la sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado sobre la cantidad de células.** En cortes de tumores se contaron el número total de núcleos en 10 campos utilizando el aumento de 20x. Los resultados se expresan como la media en la cantidad de núcleos totales contados por tumor  $\pm$  DS (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  ANOVA, post- test de Tukey).

Las diferencias en la celularidad de los tumores no solo podrían deberse a un aumento o disminución en el tamaño celular, sino que también podrían estar generadas por un aumento en la síntesis y secreción de tejido conectivo. Para resolver este interrogante se realizaron tinciones topográficas específicas en los tumores provenientes de las diferentes líneas celulares que permitieron poner de manifiesto distintos componentes del tejido conectivo. La tinción de PAS pone de manifiesto las membranas basales, principalmente subendoteliales, en color magenta. En la coloración tricrómica de Masson se distinguen las fibras de colágeno en color verde, y la impregnación con plata tiñe fibras reticulares de color negro. No se observaron entre los distintos grupos tumorales diferencias significativas en el contenido ni disposición del tejido de sostén que permitieran explicar una disminución en el número de células por área (fig 58). Teniendo esto en cuenta se puede asumir que las células del clon WT 50 tienen mayor tamaño que el resto de las líneas celulares, ocurriendo lo inverso en los clones que sobreexpresan el IGF-1R mutante.



**Figura 58: Tinciones topográficas.** Los tumores desarrollados en los ratones por todos los tipos celulares mostraron características histológicas similares en cuanto a la deposición de componentes de tejido conectivo. La impregnación con plata tiñe fibras reticulares de color negro (paneles A,D,G,J y M). La coloración de PAS pone de manifiesto las membranas basales en color magenta (paneles B,E,H,K y N). En la coloración tricrómica de Masson modificada se distinguen las fibras de colágeno en color verde (C,F,I,L y O). Línea U87 paneles A-C, clon WT 5 paneles D-F, clon Mut 5 paneles G-I, clon WT 50 paneles J-L, clon Mut 50 paneles M-O. (Aumento: 40x).

## *Discusión*

La población de pacientes pediátricos con tumores de SNC que ingresaron en este protocolo de investigación resultó homogénea con respecto al sexo, y las frecuencias tumorales encontradas estuvieron de acuerdo a lo esperado por la bibliografía para este grupo etario (109). Los gliomas fueron los tumores más representados, y dentro de estos predominaron los de bajo grado.

El estudio molecular realizado para evaluar la expresión de los componentes del sistema de los IGFs mostró que en algunos casos no todos los genes propuestos pudieron ser amplificados. Aun así, no se registraron muestras donde no pudiera amplificarse ninguno de ellos. El gen menos representado dentro de los tumores estudiados fue el IGF-1. Por otro lado, el IGF-2 resultó el gen más variable, lo que podría implicar que este gen podría estar regulado de una manera diferente y tener implicancias en las diversas patologías incluidas. Previamente ha sido descripta la sobreexpresión del IGF-2 en diversos tipos de cáncer como mama, ovario, y leucemias mieloides entre otros (174–176). Se propone que una de las causas de la misma podría ser la pérdida del imprinting del gen de IGF-2 materno, que comienza a expresarse aumentando los niveles locales de dicho factor y favoreciendo de esta manera la transformación celular (8).

Como ya se describió previamente, el IR puede presentarse en dos isoformas, la isoforma A, a la cual puede unirse el IGF-2 desencadenando efectos mitogénicos, y la isoforma B, que cumple efectos metabólicos al unir insulina. La diferencia entre las mismas es la exclusión del exón 11, que contiene 33 pb, en la isoforma A, (13), por lo cual la única manera de identificarlos es mediante la técnica de PCR en tiempo final, como fue realizado en el presente trabajo. La expresión de la isoforma A fue predominante en todas las estirpes de tumores del SNC analizadas. Esto está en concordancia con que la isoforma A del IR suele estar sobreexpresada sobre la B en

distintos tipos de cáncer como de mama, colon y pulmón, llegando a tener una la relación del 93 % de sobreexpresión en tumores de SNC (14).

Los gliomas son el grupo más numeroso dentro de los tumores pediátricos de SNC, alcanzando entre el 40 y 50 % de los mismos (114). Por otro lado, en estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo, se ha podido determinar que dentro de todos los tumores de SNC los gliomas son los únicos que presentan marcación nuclear, además de citoplasmática, para el IGF-1R detectada por IHQ (177). Por todo esto se decidió continuar el estudio analizando únicamente los gliomas, de bajo y alto grado.

La patología de los pacientes con gliomas de alto y bajo grado difiere sustancialmente, al igual que su sobrevida. Los gliomas de bajo grado son mucho más frecuentes y los pacientes llegan a un 90 % de sobrevida a los 10 años (114). Por el contrario, los gliomas de alto grado comprenden menos del 20 % de los tumores de estirpe glial en pediatría, con una tasa de sobrevida que depende del grado de resección tumoral. Si la misma es mayor al 90 % la sobrevida libre de enfermedad a 5 años es del 35%, mientras que si fue subtotal, la sobrevida baja al 17% (178).

En la población analizada en el presente trabajo, como era de esperar, se observa el predominio de gliomas de bajo grado respecto de los de alto grado. En todos los casos se analizó la expresión de los genes IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IR clasificando a los gliomas según los criterios de malignidad de la OMS (111), basados en las características histológicas y moleculares de los mismos. De esta manera los tumores fueron separados en 2 grupos, de bajo (grados I y II) y alto grado (grados III y IV). El análisis determinó que la expresión de IGF-2 fue mayor en los gliomas de bajo grado. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, en los cuales la expresión de los genes del sistema de los IGFs fue analizada según el seguimiento clínico clasificando los pacientes en vivos con y sin enfermedad o fallecidos, se pudo determinar que los tumores provenientes de los pacientes vivos con enfermedad tienen mayor expresión

de IGF-2 que los tumores de aquellos pacientes libres de tumor, con una media de seguimiento de 3 años (179). Debido a que las muestras son tomadas al momento de la cirugía, estos hallazgos permiten proponer que la evaluación de los valores de IGF-2 podría ser de utilidad para diferenciar entre los pacientes con glioma de bajo grado que continuarán o no con tumor 3 años después de la cirugía.

Como fue descripto previamente, para mediar sus acciones biológicas el IGF-2 además de unirse al IGF-1R puede hacerlo con la isoforma A del IR ( $IR_A$ ) y con el híbrido formado por estos dos receptores (180). Las acciones del IGF-2 a través del  $IR_A$  son diferentes a las acciones de la insulina a pesar de unirse al mismo receptor: mientras los efectos de la insulina son metabólicos, los desencadenados tras la unión del IGF-2 son de tipo mitogénico (13).

La desregulación en la expresión del IGF-2 ha sido descripta en múltiples tumores humanos, siendo la pérdida del *imprinting* de este gen una causa común en cáncer de mama (174), esófago (181), ovario (175), colon (182) y leucemia mieloide aguda (176). Por otro lado, las acciones del IGF-2 se ven favorecidas por el aumento en la expresión de  $IR_A$  por sobre el  $IR_B$  observada en varios tipos tumorales, incluidos los tumores de SNC (14). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados del presente trabajo no debería descartarse un rol para el circuito IGF-2/ $IR_A$  en la fisiopatología en los gliomas de bajo grado, que podría estar contribuyendo a la persistencia del tumor.

Por otro lado, así como el IGF-2 resultó tener mayor expresión en los tumores de bajo grado, la expresión del IGF-1 fue mayor en los gliomas de alto grado. Estos resultados permitirían proponer que el circuito IGF-1/IGF-1R está mayormente representado en los glioblastomas, adquiriendo un papel predominante en esta patología. Es por esta razón que se decidió modelar, sobre una línea celular de glioblastoma humano en cultivo, los efectos de la sobreexpresión del IGF-1R y su respuesta al estímulo con rhIGF-1, poniéndole más énfasis a este circuito.

Si bien al estudiar los niveles de expresión del IGF-1R en gliomas de alto y bajo grado no se evidenciaron diferencias, estudios previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que la localización nuclear de dicho receptor se asocia a un mayor grado tumoral y una menor supervivencia de los pacientes (177). En el presente trabajo se buscó modelar los efectos de la localización diferencial del IGF-1R en una línea celular de glioblastomas para tratar de explicar las diferencias observadas en la evolución a largo plazo de los pacientes.

Para el modelado *in vitro* se utilizó la línea celular de glioblastoma humano U87. Esta línea celular representa un buen modelo ya que presenta una baja expresión de IGF-1R (128,183) y permite manejar la sobreexpresión tanto del IGF-1R en su forma nativa como mutada de mejor manera. Por otro lado, si bien esta línea celular deriva de un glioma de grado IV de un individuo adulto, varias características asemejan el modelo a los gliomas pediátricos. Entre ellas podemos mencionar que las U87 presentan una mutación inactivante en la fosfatasa PTEN, que deja constitutivamente activada la vía de PI3K/AKT como ha sido descrito en la mayoría de los gliomas de alto grado pediátricos (184,185). Por otro lado, si bien la mutación en la enzima IDH se encuentra en un alto porcentaje de los glioblastomas adultos, esta línea celular no presenta mutaciones en dicho gen (186) lo cual está en coincidencia con lo descrito por Schiffman y colaboradores para gliomas de alto grado en pediatría (187).

En cuanto a los ligandos, los estudios de expresión a nivel de ARNm realizados por PCR en tiempo real muestran que la expresión de IGF-2 es muy baja en las U87, no pudiendo detectarse expresión de IGF-1. Esto había sido publicado previamente (132) y favorece el uso de esta línea celular como modelo de estudio, ya que permite atribuir los efectos observados bajo estímulo de rhIGF-1 solo al factor exógeno agregado y no a la producción de IGFs por parte de las mismas células.



En último lugar, el estudio de la expresión de las isoformas del IR en las U87 mostró un patrón similar al observado en los tumores pediátricos estudiados, con clara predominancia de la isoforma A. Estos últimos resultados apoyan una vez más el uso de esta línea celular como un buen modelo para el estudio de los glioblastomas pediátricos.

Cuando se estudia la señalización en respuesta a estímulos cortos de rhIGF-1 se puede observar tanto la fosforilación específica del IGF-1R como la activación de las vías intracelulares relacionadas con el receptor como lo son la vía de AKT y la de las MAPK42-44 y MAPK P38. En el caso de AKT, la activación es estímulo-específica, sin embargo, en las vías de la MAPK 42-44 y MAPK P38 parece existir una activación constitutiva, ya que las mismas se encuentran en su forma fosforilada aún en condiciones basales. Este fenómeno ya ha sido descrito para la línea celular U-87 MG, y se atribuye a la mutación en la enzima PTEN, que no permite que el IGF-1 estimule la vía de las MAPK. Los autores describen que cuando se reestablece la expresión de PTEN funcional, se recupera la sensibilidad al IGF-1 como respuesta en esta vía en diferentes tipos celulares (135). Por otro lado, se propone que el estímulo con IGF-1 puede activar la vía de AKT, al igual que se observa en el presente trabajo.

Al estimular las células durante períodos más largos con rhIGF-1 se pudo observar la translocación del IGF-1R endógeno de las U87 hacia el núcleo celular. El tiempo de estímulo elegido fue de 8 h, utilizado previamente por Sehat y colaboradores como el momento donde se evidenciaba la mayor translocación (71). Este resultado estaría indicando que las células U87 poseen la maquinaria necesaria (enzimas y transporte) para permitir la translocación del IGF-1R al núcleo celular.

Se verificaron los niveles de sobreexpresión en los clones generados a partir de la transfección del vector conteniendo la secuencia madura del IGF-1R como proteína de fusión con la proteína fluorescente verde (vector IGF-1R-GFP) y se seleccionaron 2

clones con sobreexpresión distinta para estudiar posibles fenotipos. No se detectó en ninguno de los clones, cambios en la expresión de los ligandos IGF-1 e IGF-2 respecto de los encontrados en la línea parental. No ocurrió lo mismo con el IR, que se mantuvo sin diferencias en el clon WT 5, pero se vio drásticamente disminuido en el clon WT 50. Esta disminución en la expresión del IR se podría atribuir a la alta sobreexpresión del IGF-1R. Dicha disminución no invalida los resultados obtenidos utilizando el inhibidor dual OSI906, ya que como la expresión del IR es baja en comparación a la de IGF-1R, los mecanismos estimulados por el rhIGF-1 deben desencadenarse a través del receptor específico.

También se verificó que la proteína de fusión GFP- IGF1R diera origen a receptores funcionales. En ambas líneas, WT 5 y WT 50, se pudo demostrar la fosforilación del IGF1R luego de un estímulo con IGF-1 por tiempos cortos y que la sobreexpresión del IGF-1R recupera la sensibilidad de la vía de las MAPK 42-44 a dicho estímulo. Con estos clones se determinó, además, la dosis a usar del inhibidor OSI906 que permite el bloqueo de la fosforilación del IGF-1R y devuelve los niveles de fosforilación de la AKT y MAPK42-44 a los valores observados para las condiciones de cultivo basales.

Por otro lado, la traslocación del IGF-1R al núcleo celular, luego de 8 h de estímulo con rhIGF-1, fue observada mediante el estudio de la fluorescencia de la GFP que se encuentra fusionada al receptor. La intensidad de la señal, como era esperado, fue mayor en los clones con 50 veces de sobreexpresión del IGF-1R. Cuando las células fueron pre-incubadas con el inhibidor OSI906, se observa que la localización nuclear del IGF-1R disminuye. Esto demuestra que es necesaria la fosforilación del IGF-1R para la posterior translocación, como ya ha sido publicado previamente (70).

Para modelar las células con el IGF-1R que no tiene capacidad de translocar al núcleo se realizó mutagénesis dirigida sobre el vector conteniendo la secuencia del receptor acoplado a GFP, mutando los tres residuos lisinas susceptibles de SUMOilación

necesarias para que el IGF-1R pueda migrar al núcleo (71). Para este fin las lisinas de las posiciones 1025, 1100 y 1120 de la proteína madura fueron reemplazadas por argininas. Estos dos son aminoácidos básicos, que difieren muy poco en su estructura, por lo que se esperaría que no haya grandes cambios en la estructura tridimensional de la proteína. Los aminoácidos en cuestión se encuentran en el dominio tirosina quinasa de la subunidad  $\beta$  del IGF-1R, sin embargo en la bibliografía se cita que el cambio de uno por otro no perjudica la capacidad de autofosforilación del receptor (71). En el presente estudio se demuestra la funcionalidad del IGF-1R mutado ante estímulos cortos con rhIGF-1, observándose solo fosforilación del receptor en las condiciones adecuadas y además conservando la capacidad de activar las vías de señalización de AKT y MAPK42-44. Por otro lado, se corroboró el efecto específico de la mutación de las lisinas 1025, 1100 y 1120 al estimular las células durante 8 h con rhIGF-1 y no observar translocación del receptor al núcleo celular.

Los clones con expresión del IGF-1R mutado, Mut 5 y Mut 50, fueron elegidos en base a los niveles de sobreexpresión de los clones WT 5 y WT 50, para contar con células que solo difieran en la capacidad del receptor de migrar al núcleo, pero no en el número de receptores por célula, y de esta manera poder atribuir los efectos observados solo a la translocación.

De los experimentos de proliferación celular se puede observar que cuando las células se cultivan en un medio suplementado con SFB, el crecimiento resulta sostenido y de manera exponencial. Se registra una menor velocidad de crecimiento para los clones que sobreexpresan 50 veces más el IGF-1R tanto en su forma nativa como mutado. Esto podría deberse al efecto deletéreo que tiene la sobreexposición a factores de crecimiento que ya ha sido descrita tanto para los IGFs como para otros factores (12). En cuanto al estímulo específico con IGF-1, si se lo compara con las condiciones basales de cultivo, no se observa un aumento en la proliferación para ningún tipo

celular. En relación con este resultado, tampoco se encontraron aumentos en la expresión de la ciclina D1 ante el estímulo con IGF-1. En la bibliografía se ha descrito que uno de los efectos del IGF-1R en el núcleo celular es su asociación con un factor de transcripción específico, LEF1, que termina por incrementar la síntesis de genes específicos como por ejemplo la ciclina D1 (77). Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo han encontrado una mayor expresión de ciclina D1 en tumores donde el IGF-1R presentaba marca nuclear por IHQ (177). La falta de aumento en la expresión de ciclina D1 en el presente trabajo podría deberse a que las células fueron cultivadas en un medio en el cual el único factor suplementario era el IGF-1. Es posible que para que se registre un aumento en la expresión de esta ciclina y por consecuencia un avance en el ciclo celular sea necesaria la presencia no solo del IGF-1R con localización nuclear, sino también de otros factores de crecimiento.

La caspasa 3 es una de las principales ejecutoras de la apoptosis celular, es producida como un zimógeno inactivo (caspasa 3 total) que se activa mediante proteólisis dando lugar a subunidades de menor peso molecular (caspasa 3 activa) (188). En el presente trabajo, al no registrar cambios en la expresión de la caspasa 3 total se puede asumir que la misma no se está activando, lo cual sugiere que la apoptosis no estaría regulada por el estímulo con IGF-1. El factor de crecimiento no estaría ejerciendo, en las condiciones de cultivo estudiadas, uno de sus conocidos efectos como protector de la apoptosis (14,189).

El sistema de los IGFs tiene distintos efectos a la hora de promover la migración de las células tumorales. Se sabe que el IGF-1R es capaz de modular el complejo de E-cadherina regulando la adhesión diferencial en células de cáncer de mama (190). Además, puede regular la producción de MMP-2 y su activador MMP-14, enzima esencial para degradar la MEC durante el proceso migratorio (191). Por otro lado, se han descrito conexiones entre las vías de señalización del proceso de transición

epitelio mesenquimal (EMT) y la vía del IGF-1R, que actuarían favoreciendo el cese de expresión de marcadores epiteliales para dar lugar a la expresión de marcadores mesenquimales como la vimentina y N-cadherina (192). En cuanto a la migración celular en los gliomas en particular, es sabido que las células de los tumores gliales que se originan en los nervios ópticos pueden invadir el hipotálamo siguiendo las radiaciones ópticas hasta llegar a la corteza occipital (193). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos tumores solo metastatizan por líquido cefalorraquídeo, y no por vías sanguínea o linfática, por lo cual pueden solo diseminarse dentro del SNC. Las metástasis fuera del SNC son muy raras para estos tipos tumorales (194).

En el presente trabajo se observó un aumento en la migración celular solo en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo luego del estímulo con IGF-1 durante 36 h. Esto estaría indicando que la baja expresión endógena del IGF-1R en la línea parental (128) no es suficiente para inducir la migración. Los clones con sobreexpresión del IGF-1R mutado tampoco mostraron aumento en la migración en respuesta a IGF-1, por lo que se puede asumir que no solo es necesario que la cantidad de IGF-1R en las células sea mayor a la encontrada en la línea parental, sino además que el IGF-1R pueda translocar al núcleo para cumplir efectos específicos sobre la migración.

Los IGFs tienen reconocidos efectos sobre el metabolismo celular, participando activamente en la regulación energética de las células tumorales (84). Se sabe que el IGF-1 tiene efectos directos en la estimulación de la vía glucolítica mediante la vía de PI3K-AKT favoreciendo la producción de energía en las células tumorales (84). En particular se ha descrito en varios tipos celulares que el IGF-1, a través de su señalización por el IGF-1R, aumenta la expresión del transportador de glucosa GLUT1 (85,195). Si el análisis se centra en el sistema nervioso central, se sabe que dentro de los transportadores de glucosa el GLUT1 es el que está presente en altas concentraciones en la barrera hematoencefálica y en los astrocitos, mientras que el

GLUT3 se expresa en neuronas y el GLUT5 en la microglía (169). Tanto GLUT1 como GLUT3 se han encontrado sobreexpresados en un gran número de tumores cerebrales (196). En el presente estudio se observó un aumento en la expresión de GLUT1 luego de 24 h de estímulo con IGF-1 en todas las líneas celulares, pero el mismo fue más importante para los clones con sobreexpresión del IGF-1R en su forma nativa (clones WT 5 y WT 50). Se propone que dos efectos estarían ocurriendo en paralelo, por un lado el aumento de expresión de GLUT1 podría estar estimulado por la vía canónica del IGF-1R que involucra su fosforilación y la activación de las vías de AKT y MAPK. En relación con este punto, en la bibliografía ya ha sido descrito que la expresión de GLUT1 puede aumentar al activarse la vía de AKT, que trae aparejado un incremento en la expresión de HIF1 $\alpha$  (197). Por otro lado, en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo que puede translocar al núcleo, podría estar ocurriendo un efecto aditivo sobre el antes descrito y por eso en estos casos el aumento en la expresión de GLUT1 es mayor, y logra diferenciarse del observado para la línea parental.

El análisis para la caracterización metabólica se continuó con la línea parental y los clones que sobreexpresan 5 veces el IGF-1R en su forma nativa o mutada. Esta elección se debe a que los niveles de expresión del IGF-1R en los gliomas pediátricos de alto grado fueron similares a los presentados por los clones con menor sobreexpresión (5 veces). La comparación de dichos niveles con los registrados en la línea parental confirma una vez más la baja expresión del IGF-1R en las células U87 (128). Por lo tanto, el uso de los clones con 5 veces de sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado es el modelo que más se acerca a lo observado en la población pediátrica estudiada.

Para continuar con el estudio del metabolismo se focalizó en las dos principales vías por las cuales las células tumorales, en particular las de glioma, pueden obtener energía (118). La glucosa que entra en las células es metabolizada por la vía glucolítica hasta

piruvato, que luego es procesado por la enzima LDH para formar lactato (34). Este proceso que se da en las células normales, solo cuando los niveles de oxígeno son bajos (glucólisis anaeróbica), comienza a tomar importancia en el metabolismo de las células cancerígenas que lo llevan a cabo en condiciones de normoxia (glucólisis aeróbica) y se lo conoce como efecto Warburg. De esta manera se logra regenerar el NAD<sup>+</sup> y permitir que la glucólisis pueda seguir sucediendo (198). Se sabe que la expresión de la enzima LDH está regulada por múltiples factores, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (34). Dentro de estos reguladores, se pueden nombrar el factor inducible por hipoxia HIF-1 (199), el factor de transcripción c-myc (200) y factores de crecimiento como el FGF a través de la activación de su receptor de tipo I (FGFR1) (201). En el presente trabajo se estudió la actividad de la enzima LDH tanto en la línea U87 como en los clones con 5 veces de sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y se encontró que esta enzima se encuentra reducida en las células que expresan el receptor mutante que no puede translocar al núcleo. Por otro lado, luego del estímulo con IGF-1 se ve un aumento en la actividad enzimática en ambos clones, WT 5 y Mut 5, que no se observa en la línea parental. Estos resultados sugieren por un lado, que es necesario que el IGF-1R pueda migrar al núcleo celular para mantener la actividad de LDH en un nivel similar al de la línea parental. Este efecto podría estar involucrando una regulación en la expresión de la enzima LDH a nivel transcripcional mediado directamente por el IGF-1R, o por algún factor de transcripción regulado por el mismo. Por otro lado, parece haber otro efecto que depende de la señalización canónica del IGF-1R como receptor de membrana, y que se ve aumentada en los casos de sobreexpresión del mismo, por eso es que el aumento en la actividad enzimática de LDH se observa en los clones y no en la línea parental cuando son estimulados con rhIGF-1. En este caso la translocación del IGF-1R al núcleo no resulta imperativa ya que el efecto se da también en el clon mutante. Dicho efecto podría

compararse al mediado por el FGFR1 que, al igual que el IGF-1R, es un receptor de tipo tirosina quinasa (202).

El aumento en la actividad enzimática de la LDH observado luego del estímulo con IGF-1 en relación a la actividad basal, es mayor en el clon Mut 5 que en el WT 5. Esto podría deberse a que el clon expresando el IGF-1R en forma nativa ya posee una actividad basal aumentada como fue discutido anteriormente y a este basal alto se suma el efecto del estímulo con IGF-1. En el caso del clon Mut 5, donde no está presente el efecto generado por el IGF-1R en el núcleo, la actividad basal de la LDH es menor, por eso el estímulo con IGF-1 genera un cambio más notable. Aun así, no se llegan a alcanzar los niveles de actividad enzimática observados en el clon WT 5.

Para complementar el estudio de la actividad de la enzima LDH se estudió la producción de lactato por parte de las mismas células. En este caso, se observa una tendencia al aumento en la producción de lactato luego del estímulo con IGF-1 en los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado que no es observada en la línea parental U87. La tendencia observada es solo estadísticamente significativa para el clon mutante, lo que estaría en relación con el mayor aumento proporcional para la LDH observado en el clon Mut 5. Es importante tener en cuenta que basalmente las células de glioma tienen una producción alta de ATP a partir de la glucólisis, por lo que el lactato producido es abundante a nivel basal (203). Es posible que la alta producción de lactato observada también en el presente trabajo dificulte la capacidad metodológica para encontrar las diferencias de producción bajo los distintos tratamientos.

El piruvato generado a partir de la glucólisis puede ingresar a la mitocondria donde es decarboxilado para dar lugar a la formación de acetil-CoA, paso mediado por el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa (204). La actividad de este complejo enzimático está principalmente regulado por las piruvato deshidrogenasa quinasas (PDKs) que lo fosforilan e inactivan, y por las piruvato deshidrogenasa fosfatasas



(PDPs) que lo desfosforilan para su activación (205). Actualmente hay descritas 4 isoformas de PDKs que están expresadas de manera tejido específica y difieren en su cinética de activación y su modulación (206). En cuanto a las PDPs, hay 2 isoformas descritas que también difieren en su activación (207).

Cuando se estudió el estado de fosforilación del PDHc en el presente trabajo se encontró que en el clon WT 5, que sobreexpresa el IGF-1R en forma nativa, la fosforilación enzimática en condiciones basales es menor que para la línea celular parental y para el clon mutante. Por otro lado, ante el estímulo con IGF-1 por 24 h, si bien la enzima parecería estar más activa (evidenciado como un descenso en su fosforilación) la diferencia de intensidad sigue siendo mayor para el clon WT 5. Nuevamente se evidencian 2 procesos distintos, una activación de la enzima PHD bajo estímulo con IGF-1 sin necesidad de que el IGF-1R transloque al núcleo celular y una necesidad del receptor en el núcleo para la activación de la enzima en condiciones basales.

Se sabe que la insulina es capaz de activar el PDHc en tejidos con capacidad adipogénica mediante el incremento de la forma desfosforilada del complejo (208). Por otro lado, se ha descrito que dichos efectos se ven completamente bloqueados tras el uso de inhibidores que bloquean las vías de señalización de AKT y ERK1/2 (209). No se descarta que en este modelo estudiado esté ocurriendo algo similar luego de la incubación con IGF-1 que activa vías similares a las del IR. Esto permitiría explicar el descenso en la fosforilación del PDHc observado bajo estímulo de IGF-1 en todos los casos estudiados. La disminución basal en la fosforilación del PDHc observada en el clon WT 5 probablemente involucre mecanismos de regulación sobre las PDKs o PDPs a nivel genómico que necesitan ser estudiados con mayor detalle.

El acetil-CoA ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante su condensación con oxalacetato para dar citrato (210). Este compuesto en condiciones fisiológicas

normales continúa el ciclo dando lugar a la generación de NADH y FADH<sub>2</sub> que aportan equivalentes de reducción para la cadena respiratoria y así se obtiene energía (211). Como ya ha sido descrito previamente, en muchos tipos de células tumorales ocurre una reprogramación en el metabolismo que genera que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos deje de tener un papel central en la producción de energía para cobrar mayor importancia en la generación de intermediarios que serán usados para distintas vías anabólicas (33). En relación con este punto, el citrato generado puede salir de la mitocondria y servir a la célula como precursor en la síntesis de ácidos grasos. En este caso, en el citoplasma se vuelve a generar acetil-CoA por la acción de la enzima ATP-citrato liasa (ACL). El acetil-CoA es tomado por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) para generar malonil-CoA a partir del cual se sintetizan los ácidos grasos de cadena larga por la acción enzimática de la ácido graso sintasa (FAS) (212). La activación inapropiada de las vías de señalización en respuesta a factores de crecimiento, ya sea por sobreexpresión de ligandos o receptores, o por activación constitutiva de las mismas, ha sido descrita previamente como responsable de la sobreexpresión de las enzimas lipogénicas antes mencionadas (40).

Para estudiar el proceso de síntesis de lípidos en el presente trabajo se focalizó en su último paso, que involucra a la enzima FAS. Se ha descrito previamente que las células de glioma expresan esta enzima y que sus niveles se incrementan con la malignidad tumoral (213).

En el presente estudio, si bien se detectó expresión de la FAS en todos los casos, esta fue mayor en el clon con sobreexpresión del IGF-1R nativo, WT 5. El resultado indica que hay una activa síntesis de ácidos grasos en las células, y que la misma se ve levemente aumentada en respuesta al estímulo con IGF-1 en los dos clones que sobreexpresan el IGF-1R, por lo cual la translocación al núcleo del IGF-1R no sería necesaria.

Una vez sintetizados, los ácidos grasos dentro de las células pueden seguir distintos caminos. En una célula en crecimiento pueden ser utilizados para sintetizar fosfolípidos que formarán parte de las membranas celulares (212), o pueden ser metabolizados por la vía de la  $\beta$ -oxidación para obtener energía (214). En células con una menor actividad metabólica pueden ser condensados con glicerol para formar triglicéridos que son almacenados en forma de gotas lipídicas en el citoplasma celular como reserva energética (215). Trabajos previos han descripto que los ácidos grasos son sustratos energéticos críticos para las células de glioma y que los utilizan como fuente primaria para producir energía (171). En cultivos celulares, donde las células de glioma no tienen acceso a ácidos grasos exógenos, los mismos pueden ser sintetizados mediante la acción de la FAS y luego ser importados a la mitocondria para ser oxidados (216). La inhibición tanto de la síntesis de ácidos grasos como de la  $\beta$ -oxidación reduce la proliferación celular (171,217). En el modelo estudiado se observó que en condiciones basales existe una mayor acumulación de gotas de lípidos en el clon con el IGF-1R mutante (Mut 5). Si bien en todos los casos luego del estímulo con IGF-1 la acumulación aumenta respecto de la condición basal, la misma sigue siendo mucho mayor en el clon Mut 5. Este resultado estaría indicando una menor actividad metabólica en este tipo celular, almacenando en el citoplasma celular los lípidos sintetizados. En cambio, para el clon con sobreexpresión del IGF-1R en forma nativa (WT 5) se registró la menor cantidad de gotas de lípidos, aún tras el estímulo con IGF-1. El estudio de la FAS comprobó que hay síntesis de lípidos activa en este tipo celular, por lo cual, si los mismos no se están acumulados, es posible que se estén utilizando para la síntesis de membranas y/o para obtener energía mediante el proceso de  $\beta$ -oxidación.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, y suponiendo que las células con sobreexpresión del IGF-1R capaz de translocar al núcleo (clon WT 5) tienen una mayor actividad metabólica, se estudió la funcionalidad del complejo proteico *mammalian*

*Target of Rapamycin* (mTORC) para su corroboración. Este complejo integra señales provenientes de factores de crecimiento con los niveles energéticos de la célula para coordinar la maquinaria biosintética y el avance de la célula a través del ciclo celular (218). Particularmente, el control de la síntesis proteica esta mediado por el complejo mTORC1 y la proteína adaptadora Raptor (219). Una vez activado el complejo, se fosforilan las proteínas S6K1 en la tirosina 389 y 4E-BP1 en la serina 65 para iniciar la traducción y la síntesis de ribosomas respectivamente (220). Los factores de crecimiento activan la vía de mTORC1 mediante la vía de señalización de PI3K-AKT, i que fosforila e inhibe a TSC2, inhibidor del complejo (221), incrementando así de manera importante la fosforilación de S6K1 y 4E-BP1 (222). En el presente trabajo se describe una mayor activación de mTORC1, evidenciada por la fosforilación de S6K, para el clon WT 5, lo que indicaría que la tasa de síntesis proteica podría ser mayor para este tipo celular y es concordante con el aumento en el metabolismo discutido previamente.

Para finalizar con el análisis in vitro se estudió si la mayor actividad metabólica observada para los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo, tenía efectos sobre el crecimiento celular impactando en el tamaño de las células. Se midieron los diámetros celulares tanto de la línea parental U87 como de las células con sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado y se encontró que este era significativamente mayor para el clon WT 5. En relación con los resultados anteriores, es esperable que las células tengan un mayor tamaño celular siendo que están metabólicamente más activas, con mayor síntesis de lípidos que no se acumulan, porque son utilizados para la síntesis de membranas o para la obtención de energía mediante la  $\beta$ -oxidación, y donde la síntesis de proteínas también se encuentra aumentada. En este caso en particular el sistema de los IGFs estaría actuando como factor de crecimiento para las células y no como mitógeno, ya que las mismas sintetizan

mayor cantidad de biomoléculas y crecen en tamaño, pero la proliferación celular no parece estar afectada.

Una vez que las células parentales o los clones con sobreexpresión del IGF-1R nativo o mutado fueron inyectadas de manera subcutánea en ratones inmunodeficientes, en todos los casos se observó desarrollo tumoral. El periodo de latencia para la aparición de tumores medibles fue menor para los clones WT y mayor para los clones con el IGF-1R mutado en comparación con la línea parental. En este escenario se descarta que la aparición más rápida de los tumores se deba solo a los niveles de sobreexpresión del IGF-1R y da pautas de la importancia que tiene la posibilidad del receptor de translocar al núcleo celular.

En relación con el resultado antes descrito, se observó que los tumores desarrollados por los clones WT alcanzan también un mayor volumen y tienen una mayor proliferación celular. Estudios previos realizados por Seely y colaboradores en los cuales células U87 fueron inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, de manera similar al presente estudio, muestran que el tratamiento de los ratones con un anticuerpo bloqueante del IGF-1R inhibe el desarrollo tumoral en un 60%. Por otro lado, en los casos en que los tumores aparecen, el tratamiento disminuye el crecimiento y aumenta la apoptosis intratumoral (137). Estos resultados estarían destacando la importancia de la señalización del IGF-1R para que los tumores puedan desarrollarse, pero no hacen distinción en la localización intracelular del IGF-1R. Por otro lado, como ya se describió previamente, trabajos de Warsito y colaboradores demuestran que el IGF-1R en el núcleo interactúa con el factor de transcripción LEF1, aumentando la expresión de genes como la ciclina D1, que juega un importante papel en la progresión del ciclo celular (77). Por último, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo también encuentran una mayor expresión de la ciclina D1 en muestras de gliomas pediátricos en los cuales IGF-1R presenta localización nuclear (177). Lo observado en

el presente trabajo para tumores desarrollados por los clones WT en los cuales el IGF-1R puede translocar al núcleo podría involucrar un cambio en la expresión de genes que promuevan el avance del ciclo celular, dentro de los cuales podría encontrarse la ciclina D1, generando de esta manera una mayor proliferación celular y, por ende, un mayor crecimiento en los tumores.

Como fue descrito anteriormente, en el presente trabajo se estudió la proliferación de las líneas celulares in vitro y no se encontraron diferencias cuando fueron estimuladas con IGF-1. Debe ser tenido en cuenta que en los estudios in vitro las células estaban siendo cultivadas con una concentración muy baja de SFB y solo estimuladas con IGF-1 para focalizar en los efectos específicos de dicho factor. Esta situación se modifica ampliamente cuando las células son inyectadas en un animal, donde la disposición de factores de crecimiento, además del IGF-1, es inmensa. Una vez más se plantea la posibilidad de que el IGF-1 a través de su receptor esté actuando como factor de crecimiento y no como mitógeno, preparando a las células para multiplicarse de manera más eficiente una vez que otros factores con capacidad mitogénica estén presentes.

Ya había sido observado en los estudios in vitro que las células de los clones WT tienen mayor tamaño que las células de los clones mutantes. En los tumores es mucho más difícil medir el tamaño celular, ya que en un preparado histológico coexisten células con distintas incidencias de corte, pudiendo dar un resultado que se aleja de la realidad. Para intentar remediar este inconveniente se realizaron dos estudios complementarios; por un lado, se registró el número de células, mediante el conteo de núcleos, en un número fijo de campos en los diferentes tumores evaluados con el mismo aumento. Por otro lado, se estudió mediante tinciones topográficas la deposición de tejido conectivo en los distintos tipos tumorales. En cuanto al primer punto, si se los compara con los tumores generados tras la inyección de la línea parental U87, se encontró que la cantidad de núcleos es mayor en los tumores desarrollados por los clones mutantes. El

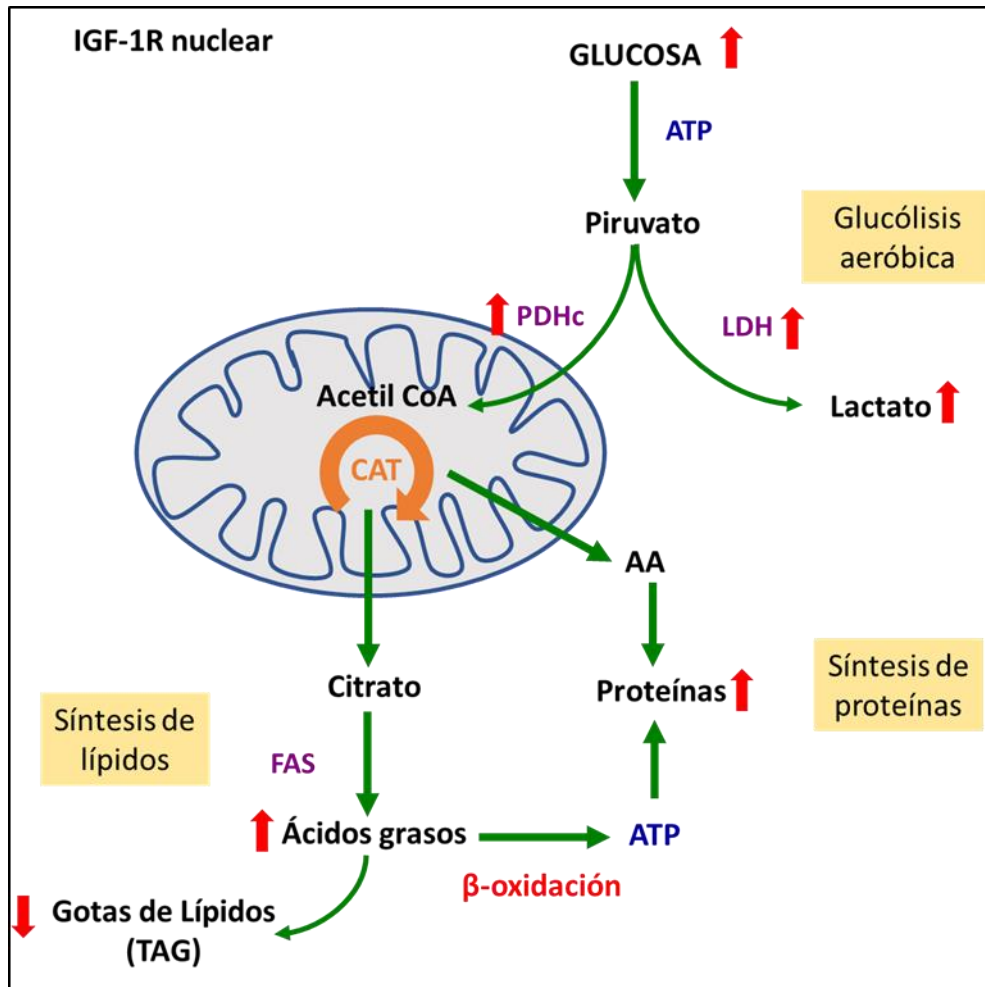
análisis histológico de las tinciones topográficas demostró que no hay diferencias significativas en la deposición de componentes del tejido conectivo como proteoglicanos, glicoproteínas, colágeno o fibras reticulares cuando se comparan los tumores generados por todas las líneas celulares en estudio. Por lo tanto, se podría asumir que las células de los clones Mut 5 y Mut 50 tienen un menor tamaño dado que no existen diferencias en la deposición de matriz extracelular que justifiquen una mayor separación entre células y que se contabiliza una mayor cantidad de núcleos. Este resultado confirma lo observado in vitro y resalta el papel necesario de la translocación del IGF-1R al núcleo celular para que las células tengan, además de un mayor metabolismo, un mayor tamaño y mejor capacidad para proliferar in vivo.

## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**

En resumen, la localización nuclear del IGF-1R actuaría *in vitro* aumentando la migración y el metabolismo, sin modificar la proliferación celular. El aumento en la actividad metabólica queda evidenciado por el aumento en la incorporación de glucosa que es usado no solo para la obtención de energía mediante glucólisis aeróbica, proceso que también se ve beneficiado, sino para la producción de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Lo antes descrito permite además explicar la mayor producción de ácidos grasos que son luego metabolizados en el proceso de  $\beta$ -oxidación. El IGF-1R nuclear actuaría favoreciendo la producción de energía, en detrimento de la acumulación de lípidos para reserva y la energía producida podría ser utilizada en procesos como la síntesis proteica. Las células con una mayor tasa metabólica y mayor síntesis de componentes celulares, lo que explica su mayor tamaño, estarían preparándose para poder dividirse de manera más eficiente en un contexto favorable. Una vez inyectadas, en un contexto fisiológico, con presencia de variados factores de crecimiento, la ventaja metabólica otorgada por la capacidad del IGF-1R de migrar al núcleo celular da lugar a una mayor tasa proliferativa que lleva a que los tumores aparezcan antes y sean más grandes.

Para concluir, se propone que la localización nuclear del IGF-1R podría contribuir a un fenotipo más agresivo en las células de glioblastoma al incrementar su motilidad y metabolismo que permitiría explicar, al menos en parte, el comportamiento de estos tumores de alto grado en la población pediátrica estudiada, asociado a un peor pronóstico.





**Figura 59: Efecto sobre el metabolismo celular de la translocación del IGF-1R al núcleo en células de glioblastoma humano.** Se resumen los efectos observados *in vitro* en los clones con sobreexpresión del IGF-1R en forma nativa. El aumento en la incorporación de glucosa, acompañado por un aumento en el proceso de glucólisis aeróbica y un incremento en la síntesis de lípidos y proteínas, tendría como efecto el crecimiento celular y la preparación para una mayor división celular en un contexto fisiológico. AA: aminoácidos, LDH: Lactato deshidrogenasa, PDHc: complejo de la piruvato deshidrogenasa, FAS: ácido graso sintasa, CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

## *Conclusión general*

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo caracterizar el papel del sistema de los IGFs en diferentes etapas del proceso tumoral en dos modelos con importancia en pediatría: el feocromocitoma, asociado con frecuencia a enfermedad endocrina familiar y los gliomas, tumores sólidos más frecuentes en los niños.

Si bien el feocromocitoma es un tumor poco frecuente en su forma esporádica, su incidencia está asociada hasta en un 40% a enfermedades hereditarias. Por otro lado, es un tumor que puede ser maligno en un 5-25%. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado la sobreexpresión del IGF-1R en feocromocitomas malignos y su valor pronóstico para la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad. Al modelar este tumor *in vivo* e *in vitro* se ha destacado la importancia del IGF-1 como factor de supervivencia en las células feocromocitoma. En esta oportunidad nos interesamos en el estudio del IGF-1R presente en las células que componen el microambiente tumoral. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* demuestran que en las etapas tempranas del establecimiento tumoral la deficiencia del IGF-1R resulta perjudicial para las células de feocromocitoma, a través de la regulación de factores solubles y componentes de la matriz extracelular importantes para la supervivencia del tumor. Estos hallazgos ponen de manifiesto, una vez más, la gran importancia de considerar a los tumores como órganos o tejidos complejos a la hora de plantear posibles terapias para su tratamiento.

Por otro lado, los tumores de SNC son los tumores sólidos de mayor frecuencia en pediatría, siendo los gliomas el grupo mayoritario. Si bien se sabe que la activación del sistema de los IGFs contribuye a la progresión de este tipo tumoral existe poca información que focalice en el estudio de la patología en edad pediátrica. Nuestro grupo de investigación, en un estudio que lleva incluidos más de 100 pacientes, ha demostrado que en gliomas la localización nuclear del receptor IGF-1R se asocia a un mayor grado tumoral y una menor supervivencia de estos pacientes.

En el presente trabajo se caracterizó la expresión de los genes del sistema de los IGFs en **tumores de SNC de pacientes pediátricos** y se puntualizó su estudio en gliomas, separando a los mismos según grados de malignidad. Nuestros resultados muestran una mayor expresión de IGF-1 en gliomas de alto grado, remarcando la importancia del circuito IGF1R/IGF1 en dicho grupo tumoral. Por otro lado, la caracterización **in vitro** de la localización diferencial del IGF-1R en una línea celular de glioblastoma humano demostró que la localización nuclear del IGF-1R podría contribuir a un fenotipo más agresivo en las células al incrementar su motilidad y metabolismo, lo cual se manifiesta **in vivo** en la aparición de tumores más tempranamente y de crecimiento más rápido en nuestros grupos experimentales. En un contexto más cercano al fisiológico la ventaja metabólica facilitaría que las células puedan dividirse de manera más eficiente, formando tumores más agresivos. Estos resultados permitirían explicar, al menos en parte, el comportamiento de estos tumores de alto grado en la población pediátrica estudiada, asociado a un peor pronóstico.

Para finalizar, considerado en su conjunto, la realización de este trabajo de tesis de estas características permitió la articulación entre grupos de investigación básica con actores abocados a la atención clínica, consolidando de esta forma el objetivo de investigación básica traslacional.

# *Resumen*

La *carcinogénesis* es un proceso de múltiples pasos por el cual células normales se transforman en células tumorales. Las señales que facilitan estos procesos están lideradas en su mayoría por factores de crecimiento que actúan sobre receptores específicos regulando la progresión del ciclo celular y crecimiento e influenciando también su metabolismo y supervivencia. La interacción de las células tumorales y las células del estroma tumoral está involucrada tanto en el establecimiento como en la adquisición de determinadas características como invasividad y capacidad de generar metástasis. Por lo tanto, los cambios patológicos que se dan en el **microambiente** son tan importantes para el progreso de la enfermedad como las características de la **célula tumoral** en sí.

Los factores de crecimiento insulino-símiles (IGFs) son polipéptidos relacionados estructuralmente con la Insulina, que juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular y en la inhibición de la apoptosis. La disrupción del balance entre los distintos componentes del sistema de los IGFs y su vinculación con el crecimiento, mantenimiento y progresión tumoral ha sido demostrada en diferentes tipos tumorales y se ha sugerido que dicho sistema tendría un rol en las etapas tempranas de transformación celular y carcinogénesis. La importancia del sistema de los IGFs en la iniciación, progresión y metástasis tumoral ha sido también confirmada mediante estudios utilizando animales modificados genéticamente.

El **objetivo** del presente trabajo de tesis fue caracterizar el papel del sistema de los IGFs en diferentes etapas del proceso tumoral en dos modelos con importancia en pediatría. Nuestra **hipótesis** es que el sistema de los IGFs tiene un papel en el desarrollo tumoral tanto a nivel del establecimiento inicial del tumor como en su crecimiento y progresión. Para el estudio de las primeras etapas del establecimiento tumoral nos interesamos en el circuito **local** del IGF-1/ IGF-1R en las **células que componen el microambiente tumoral** en un modelo de feocromocitoma. Para el estudio del crecimiento y progresión tumoral nos

enfocamos en los efectos de los **IGFs en las células tumorales**, particularmente en tumores de sistema nervioso central.

El feocromocitoma es un tumor asociado con frecuencia a enfermedad endocrina familiar. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado la sobreexpresión del IGF-1R en feocromocitomas malignos y su valor pronóstico para la sobrevida de los pacientes con esta enfermedad. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron la importancia del IGF-1 como factor de supervivencia en las células del feocromocitoma. En esta oportunidad estudiamos el IGF-1R presente en las células que componen el microambiente tumoral. Nuestros resultados *in vivo*, utilizando un modelo murino generado por la inyección de células de feocromocitoma (MPC) en ratones haploinsuficientes para el IGF-1R, muestran que la incidencia de tumores en estos ratones disminuye y la aparición tumoral se ve retrasada. Una vez establecidos, la proliferación, apoptosis y vascularización de estos tumores no varía respecto de los generados en ratones control. *In vitro*, se cultivaron los fibroblastos de ratones controles y haploinsuficientes para el IGF-1R para generar medios condicionados y matrices diferenciales con los que se cultivaron las células MPC. Encontramos que la proliferación celular fue menor cuando las MPC eran cultivadas con medios condicionados o matrices diferenciales provenientes de fibroblastos haploinsuficientes para el IGF-1R. El estudio molecular permitió confirmar en estos fibroblastos la disminución en la secreción de factores solubles, IGF-1 e IGFBP2, y de fibronectina como factor de matriz, la cual se asoció a la disminución en la expresión de integrinas en las células MPC. Nuestros datos sugieren que el IGF-1, a través del IGF-1R estaría involucrado en las etapas tempranas del establecimiento tumoral, contribuyendo al anclaje y sobrevida de las células MPC mediante la interacción con factores de solubles y de matriz producidos por los fibroblastos del microambiente.

Por otro lado, los tumores de SNC son los tumores sólidos de mayor frecuencia en pediatría, siendo los gliomas el grupo mayoritario. Nuestro grupo ha demostrado que en

gliomas la localización nuclear del receptor IGF-1R se asocia a un mayor grado tumoral y a menor supervivencia de estos pacientes. En el presente trabajo se caracterizó la expresión de los genes del sistema de los IGFs en **tumores gliales de pacientes pediátricos** separándolos según grados de malignidad. Encontramos una mayor expresión de IGF-1 en tumores de alto grado, lo que podría estar indicando un papel preponderante del circuito IGF-1/IGF-1R en esta patología.

En un enfoque experimental se realizó la caracterización **in vitro** de la localización diferencial del IGF-1R en una línea celular de glioblastoma humano y se demostró que la localización nuclear del receptor no modifica la proliferación ni apoptosis de estas células, pero sí incrementa su motilidad y metabolismo. La mayor tasa metabólica queda evidenciada por el aumento en la expresión del transportador de glucosa GLUT1, aumento en la entrada de piruvato a la mitocondria y el aumento en la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, en las células con IGF-1R nuclear se observa una baja acumulación de los lípidos sintetizados, por lo que se asume que estos son oxidados para obtener energía que es luego utilizada en procesos como la síntesis de proteínas, que también se encuentra aumentada. La ventaja metabólica queda manifestada **in vivo** con la aparición de tumores más tempranamente y de crecimiento más rápido en los casos en que el IGF-1R puede translocar al núcleo. Estos resultados permitirían explicar, al menos en parte, el comportamiento de estos tumores de alto grado en la población pediátrica estudiada, asociado a un peor pronóstico.



## *Bibliografía*

1. **Pardee AB.** G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246(4930):603–8.
2. **Cross M, Dexter TM.** Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 1991;64(2):271–80.
3. **LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT.** Insulin-like growth factors and cancer. *Ann. Intern. Med.* 1995;122(1):54–9.
4. **Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995;16(1):3–34.
5. **Pivonello C, De Martino MC, Negri M, Cuomo G, Cariatì F, Izzo F, Colao A, Pivonello R.** The GH-IGF-SST system in hepatocellular carcinoma: biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Infect. Agent. Cancer* 2014;9:27.
6. **O'Dell SD, Day INM.** Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998;30(7):767–771.
7. **Humbel RE.** Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1990;190(3):445–462.
8. **Livingstone C.** IGF2 and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2013. doi:10.1530/ERC-13-0231.
9. **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts Jr. CT.** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16(2):143–163.
10. **Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al.** Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986;5(10):2503–2512.
11. **Kim B, Leventhal PS, Saltiel AR, Feldman EL.** Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1997;272(34):21268–21273.
12. **Pavelic J, Matijevic T, Knezevic J.** Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res* 2007;125(4):511–522.
13. **Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R.** Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 2009;30(6):586–623.
14. **Lodhia KA, Tienchaiananda P, Haluska P.** Understanding the Key to Targeting the IGF Axis in Cancer: A Biomarker Assessment. *Front. Oncol.* 2015. doi:10.3389/fonc.2015.00142.
15. **Kornfeld S.** Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992;61:307–330.
16. **Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16(1):3–34.
17. **Baxter RC.** Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278(6):E967–76.
18. **Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT.** Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10028–10033.
19. **Clemmons DR.** Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140(1–2):19–24.
20. **Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S.** Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997;18(6):801–831.
21. **Firth SM, Baxter RC.** Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002;23(6):824–854.
22. **Iosef C, Gkourasas T, Jia CY, Li SS, Han VK.** A functional nuclear localization signal in insulin-like growth factor binding protein-6 mediates its nuclear import. *Endocrinology* 2008;149(3):1214–1226.
23. **Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC.** Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J Biol Chem* 2000;275(31):23462–23470.
24. **Azar WJ, Azar SH, Higgins S, Hu JF, Hoffman AR, Newgreen DF, Werther GA, Russo VC.** IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology* 2011;152(9):3332–3342.
25. **Russo VC, Azar WJ, Yau SW, Sabin MA, Werther GA.** IGFBP-2: The dark horse in

- metabolism and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):329–346.
26. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
  27. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.
  28. **Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD.** Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. In: *Advances in immunology*. Vol 90.; 2006:1–50.
  29. **Yang L, Pang Y, Moses HL.** TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010;31(6):220–227.
  30. **Kroemer G, Pouyssegur J.** Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 2008;13(6):472–482.
  31. **Slater EC.** Mechanism of Oxidative Phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 1977;46(1):1015–1026.
  32. **WARBURG O.** On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123(3191):309–14.
  33. **Corrado M, Scorrano L, Campello S.** Changing perspective on oncometabolites: from metabolic signature of cancer to tumorigenic and immunosuppressive agents. *Oncotarget* 2016. doi:10.18632/oncotarget.8727.
  34. **Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ.** The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol.* 2016. doi:10.1111/bpa.12299.
  35. **Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ.** Acid-Mediated Tumor Invasion: a Multidisciplinary Study. *Cancer Res.* 2006;66(10):5216–5223.
  36. **Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM.** Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139(5):891–906.
  37. **Joyce JA, Pollard JW.** Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):239–252.
  38. **Kalluri R, Zeisberg M.** Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(5):392–401.
  39. **Schedin P, Elias A.** Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res* 2004;6(2):93–101.
  40. **Swinnen J V., Brusselmans K, Verhoeven G.** Increased lipogenesis in cancer cells: New players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2006. doi:10.1097/01.mco.0000232894.28674.30.
  41. **Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R.** Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal* 2011;9:18.
  42. **Calorini L, Bianchini F.** Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. *Cell Commun Signal* 2010;8:24.
  43. **Brabek J, Mierke CT, Rosel D, Vesely P, Fabry B.** The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal* 2010;8:22.
  44. **Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ.** Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J* 2008;95(11):5374–5384.
  45. **Polyak K, Weinberg RA.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 2009;9(4):265–73.
  46. **Friedl P, Alexander S.** Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* 2011. doi:10.1016/j.cell.2011.11.016.
  47. **Ronnov-Jessen L, Petersen OW.** Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 1993;68(6):696–707.
  48. **Shimoda M, Mellody KT, Orimo A.** Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(1):19–25.
  49. **Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA.** Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8(8):604–617.
  50. **Adams RH, Alitalo K.** Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(6):464–478.

- 
51. **Kerbel RS.** Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358(19):2039–2049.
  52. **Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF.** Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(3):321–331.
  53. **Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE.** The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21(3):215–244.
  54. **LeRoith D, Roberts Jr. CT.** The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003;195(2):127–137.
  55. **Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE.** Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):505–518.
  56. **Baserga R.** The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 1995;55(2):249–252.
  57. **Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE.** The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr. Rev.* 2000;21(3):215–44.
  58. **Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M.** Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279(5350):563–6.
  59. **Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M.** Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;351(9113):1393–1396.
  60. **Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ.** Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(7):620–625.
  61. **Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X.** Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(2):151–156.
  62. **DeAngelis T, Ferber A, Baserga R.** Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol* 1995;164(1):214–221.
  63. **Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD.** Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 1990;10(2):464–473.
  64. **Kim HJ, Litzénburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X, Lewis MT, Gottardis MM, Wong TW, Attar RM, Carboni JM, Lee A V.** Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Mol Cell Biol* 2007;27(8):3165–3175.
  65. **Georgii-Hemming P, Wiklund HJ, Ljunggren O, Nilsson K.** Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88(6):2250–2258.
  66. **Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P.** Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int. J. Cancer* 2005;114(2):249–56.
  67. **Perks CM, Holly JM.** The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer. *Breast Dis* 2003;18:45–60.
  68. **Perks CM, Holly JM.** IGF-BPs and breast cancer. *Breast Dis* 2003;17:91–104.
  69. **Hellawell GO, Turner GDH, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM.** Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res.* 2002;62(10):2942–50.
  70. **Aleksic T, Chitnis MM, Perestenko O V., Gao S, Thomas PH, Turner GD, Protheroe AS, Howarth M, Macaulay VM.** Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Translocates to the Nucleus of Human Tumor Cells. *Cancer Res.* 2010;70(16):6412–6419.
  71. **Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocmé E, Liljedahl U, Lagergren J, Larsson O.** SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci. Signal.* 2010;3(108):ra10.
  72. **Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT.** Identification of the enzyme required

- for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J. Biol. Chem.* 1999;274(15):10618–24.
73. **Packham S, Warsito D, Lin Y, Sadi S, Karlsson R, Sehat B, Larsson O.** Nuclear translocation of IGF-1R via p150Glued and an importin- $\beta$ /RanBP2-dependent pathway in cancer cells. *Oncogene* 2015;34(17):2227–2238.
  74. **Sarfstein R, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A, Edry L, Shomron N, Warman N, Wertheimer E, Maor S, Shochat L, Werner H.** Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR) Translocates to Nucleus and Autoregulates IGF-IR Gene Expression in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 2012;287(4):2766–2776.
  75. **van Gaal JC, Roeffen MHS, Flucke UE, van der Laak JAWM, van der Heijden G, de Bont ESJM, Suurmeijer AJH y y col.** Simultaneous targeting of insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: a rational choice. *Eur. J. Cancer* 2013;49(16):3462–70.
  76. **Palmerini E, Benassi MS, Quattrini I, Pazzaglia L, Donati D, Benini S, Gamberi G, Gambarotti M, Picci P, Ferrari S.** Prognostic and predictive role of CXCR4, IGF-1R and Ezrin expression in localized synovial sarcoma: is chemotaxis important to tumor response? *Orphanet J. Rare Dis.* 2015;10:6.
  77. **Warsito D, Sjöström S, Andersson S, Larsson O, Sehat B.** Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep.* 2012. doi:10.1038/embor.2011.251.
  78. **Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B.** Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J* 1998;17(17):5085–5094.
  79. **Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E.** Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275(28):21695–21702.
  80. **Punglia RS, Lu M, Hsu J, Kuroki M, Tolentino MJ, Keough K, Levy AP, Levy NS, Goldberg MA, D'Amato RJ, Adamis AP.** Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes* 1997;46(10):1619–1626.
  81. **Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K.** IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J* 1999;46 Suppl:S59–62.
  82. **Feldser D, Agani F, Iyer N V, Pak B, Ferreira G, Semenza GL.** Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59(16):3915–3918.
  83. **Tang Y, Zhang D, Fallavollita L, Brodt P.** Vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis are regulated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 2003;63(6):1166–1171.
  84. **Werner H.** Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene* 2012;31(22):2703–2714.
  85. **Baumann MU, Schneider H, Malek A, Palta V, Surbek D V., Sager R, Zamudio S, Illsley NP.** Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). *PLoS One* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0106037.
  86. **Hakam A, Yeatman TJ, Lu L, Mora L, Marcet G, Nicosia S V, Karl RC, Coppola D.** Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999;30(10):1128–1133.
  87. **All-Ericsson C, Girnita L, Seregard S, Bartolazzi A, Jager MJ, Larsson O.** Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(1):1–8.
  88. **DiGiovanni J, Kiguchi K, Frijhoff A, Wilker E, Bol DK, Beltran L, Moats S, Ramirez A, Jorcano J, Conti C.** Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3455–3460.
  89. **DiGiovanni J, Bol DK, Wilker E, Beltrán L, Carbajal S, Moats S, Ramirez A, Jorcano J, Kiguchi K.** Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion. *Cancer Res.* 2000;60(6):1561–70.
  90. **Franks SE, Campbell CI, Barnett EF, Siwicky MD, Livingstone J, Cory S, Moorehead**

- RA. Transgenic IGF-IR overexpression induces mammary tumors with basal-like characteristics, whereas IGF-IR-independent mammary tumors express a claudin-low gene signature. *Oncogene* 2012;31(27):3298.
91. **Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, Kahn CR.** Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest* 2003;111(12):1835–1842.
  92. **Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D.** Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(13):7324–7329.
  93. **Moore T, Carbajal S, Beltran L, Perkins SN, Yakar S, Leroith D, Hursting SD, Digiovanni J.** Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with low circulating insulin-like growth factor I levels. *Cancer Res* 2008;68(10):3680–3688.
  94. **Wu Y, Cui K, Miyoshi K, Hennighausen L, Green JE, Setser J, LeRoith D, Yakar S.** Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Res* 2003;63(15):4384–4388.
  95. **Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D.** Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2002;62(4):1030–1035.
  96. **Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y.** IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003;421(6919):182–187.
  97. **Holzenberger M, Leneuve P, Hamard G, Ducos B, Perin L, Binoux M, Le Bouc Y.** A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology* 2000;141(7):2557–2566.
  98. **Yucha C, Blakeman N.** Pheochromocytoma. The great mimic. *Cancer Nurs* 1991;14(3):136–140.
  99. **Beard CM, Sheps SG, Kurland LT, Carney JA, Lie JT.** Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 1983;58(12):802–804.
  100. **Audí L, Calzada R, Cassorla F, Diéguez C, Ferrández A, Heinrich JJ, Lanes R, Moya M, Sandrini R, Tojo R BM.** Tratado de Endocrinología Pediátrica POMBO. 2010.
  101. **Eisenhofer G, Bornstein SR, Brouwers FM, Cheung NK, Dahia PL, de Krijger RR, Giordano TJ, Greene LA, Goldstein DS, Lehnert H, Manger WM, Maris JM, Neumann HP, Pacak K, Shulkin BL, Smith DI, Tischler AS, Young Jr. WF.** Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(3):423–436.
  102. **Weber MM, Fottner C, Wolf E.** The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumorigenesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000;30 Suppl 3:69–75.
  103. **Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P.** The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007;28(1):20–47.
  104. **Fernandez MC, Martin A, Venara M, Calcagno M de L, Sansó G, Quintana S, Chemes HE, Barontini M, Pennisi PA.** Overexpression of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) is associated with malignancy in familial pheochromocytomas and paragangliomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2013;79(5):623–30.
  105. **Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, Bedri S, Alroy J, Shahsavari M, Tischler AS.** Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell Tissue Res* 2000;302(3):309–320.
  106. **Powers JF, Schelling KH, Brachold JM, Tischler AS.** Plasticity of pheochromocytoma cell lines from neurofibromatosis knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:371–378.
  107. **Fernandez MC, Venara M, Nowicki S, Chemes HE, Barontini M, Pennisi PA.** Igf-I regulates pheochromocytoma cell proliferation and survival in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2012;153(8):3724–3734.
  108. **Pizzo PA, Poplack DG, Adamson PC, Blaney SM, Helman L (Lee).** *Principles and practice of pediatric oncology*.
  109. **Argentina) MF (Instituto N del C-M de S-R. ROHA 2015; 2015.** doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
  110. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A, Scheithauer BW, Kleihues P.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.

- Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109.
111. **Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW.** The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–820.
  112. **Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW.** The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993;3(3):255–68.
  113. **Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J.** CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro. Oncol.* 2014;16 Suppl 4(suppl\_4):iv1-iv63.
  114. **Gupta N, Banerjee A, Haas-Kogan DA.** *Pediatric CNS Tumors.* Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-30789-3.
  115. **Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD, Rheinbay E y col.** Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(26):2481–2498.
  116. **Pollack IF.** Multidisciplinary management of childhood brain tumors: a review of outcomes, recent advances, and challenges. *J. Neurosurg. Pediatr.* 2011;8(2):135–48.
  117. **Lassaletta A, Scheinemann K, Zelcer SM, Hukin J, Wilson BA, Jabado N, Carret AS, Lafay-Cousin L, Larouche V, Hawkins CE, Pond GR, Poskitt K, Keene D, Johnston DL, Eisenstat DD, Krishnatry R, Mistry M, Arnoldo A, Ramaswamy V, Huang A, Bartels U, Tabori U, Bouffet E.** Phase II Weekly Vinblastine for Chemotherapy-Na?ve Children With Progressive Low-Grade Glioma: A Canadian Pediatric Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* 2016;34(29):3537–3543.
  118. **Strickland M, Stoll EA.** Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front. cell Dev. Biol.* 2017;5:43.
  119. **Novosyadlyy R, LeRoith D.** Insulin-Like Growth Factors and Insulin: At the Crossroad Between Tumor Development and Longevity. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2012;67A(6):640–651.
  120. **Glick RP, Lichtor T, Unterman TG.** Insulin-like growth factors in central nervous system tumors. *J. Neurooncol.* 1997;35(3):315–325.
  121. **Sandberg A-C, Engberg C, Lake M, von Holst H, Sara VR.** The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci. Lett.* 1988;93(1):114–119.
  122. **Trojan J, Cloix J-F, Ardourel M-Y, Chatel M, Anthony DD.** Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience* 2007. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.021.
  123. **Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M.** Expression of insulin-like growth factors I and II and their receptor mRNAs in primary human astrocytomas and meningiomas; in vivo studies using in situ hybridization and immunocytochemistry. *Int. J. cancer* 1992;50(2):215–22.
  124. **Sandberg-Nordqvist AC, Ståhlbom PA, Reinecke M, Collins VP, von Holst H, Sara V.** Characterization of insulin-like growth factor 1 in human primary brain tumors. *Cancer Res.* 1993;53(11):2475–8.
  125. **Hirano H, Lopes MB, Laws ER, Asakura T, Goto M, Carpenter JE, Karns LR, VandenBerg SR, VandenBerg SR.** Insulin-like growth factor-1 content and pattern of expression correlates with histopathologic grade in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neuro. Oncol.* 1999;1(2):109–19.
  126. **Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K.** Insulin Growth Factor-2 Binding Protein 3 (IGF2BP3) Is a Glioblastoma-specific Marker That Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase (PI3K/MAPK) Pathways by Modulating IGF-2. *J. Biol. Chem.* 2011;286(29):25882–25890.
  127. **Soroceanu L, Kharbanda S, Chen R, Soriano RH, Aldape K, Misra A, Zha J, Forrest WF, Nigro JM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Phillips HS.** Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in

- glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(9):3466–3471.
128. **Zamykal M, Martens T, Matschke J, Gunther HS, Kathagen A, Schulte A, Peters R, Westphal M, Lamszus K.** Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor involves different context-dependent mechanisms. *Neuro. Oncol.* 2015. doi:10.1093/neuonc/nou344.
  129. **Maris C, D'Haene N, Trépant A-L, Le Mercier M, Sauvage S, Allard J, Rorive S, Demetter P, Decaestecker C, Salmon I.** IGF-IR: a new prognostic biomarker for human glioblastoma. *Br. J. Cancer* 2015;113(5):729–737.
  130. **Busby Jr. WH, Nam TJ, Morales A, Smith C, Jennings M, Clemmons DR.** The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium. *J Biol Chem* 2000;275(48):37638–37644.
  131. **Friend KE, Khandwala HM, Flyvbjerg A, Hill H, Li J, McCutcheon IE.** Growth hormone and insulin-like growth factor-I: effects on the growth of glioma cell lines. *Growth Horm. IGF Res.* 2001;11(2):84–91.
  132. **Schlenska-Lange A, Knüpfer H, Lange TJ, Kiess W, Knüpfer M.** Cell proliferation and migration in glioblastoma multiforme cell lines are influenced by insulin-like growth factor I in vitro. *Anticancer Res.* 2008.
  133. **Brockmann M-A, Ulbricht U, Grüner K, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K.** Glioblastoma and Cerebral Microvascular Endothelial Cell Migration in Response to Tumor-associated Growth Factors. *Neurosurgery* 2003;52(6):1391–1399.
  134. **Rorive S, Berton A, D'haene N, Takacs CN, Debeir O, Decaestecker C, Salmon I.** Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas. *Glia* 2008;56(15):1679–1690.
  135. **Lackey J, Barnett J, Davidson L, Batty IH, Leslie NR, Downes CP.** Loss of PTEN selectively desensitizes upstream IGF1 and insulin signaling. *Oncogene* 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210520.
  136. **Lassaletta A, Zapotocky M, Bouffet E, Hawkins C, Tabori U.** An integrative molecular and genomic analysis of pediatric hemispheric low-grade gliomas: an update. *Child's Nerv. Syst.* 2016. doi:10.1007/s00381-016-3163-6.
  137. **Seely BL, Samimi G, Webster NJG.** Retroviral expression of a kinase-defective IGF-I receptor suppresses growth and causes apoptosis of CHO and U87 cells in-vivo. *BMC Cancer* 2002. doi:10.1186/1471-2407-2-15.
  138. **Olfert E, Cross B and McWilliam A.** GUIDE TO THE CARE AND USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS. 1993;Volume 1.
  139. **Froment P, Vigier M, Negre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, Holzenberger M, Durand P.** Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol* 2007;194(3):557–568.
  140. **Jensen MM, Jorgensen JT, Binderup T, Kjaer A.** Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging* 2008;8:16.
  141. **Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J.** Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1–8.
  142. **Takashima A.** Establishment of fibroblast cultures. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1998;2.1.1-2.1.12.
  143. **Sacca PA, Pistone Creydt v, Tesone A and Calvo J C.** A novel and alternative in vitro method using microwave to study the epithelial-stromal interactions. *Sci. Res. Essay* 2009;Vol.4 (12):1487–1495.
  144. **Kasibhatla S.** Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006;2006(21):pdb.prot4493-pdb.prot4493.
  145. **Pennisi PA, Barr V, Nunez NP, Stannard B, Le Roith D.** Reduced expression of insulin-like growth factor I receptors in MCF-7 breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype. *Cancer Res* 2002;62(22):6529–6537.
  146. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
  147. **Ghahary A, Shen Q, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE.** Induction of transforming growth factor  $\beta$ 1 by insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 1998;174(3):301–309.



148. **Pais RS, Moreno-Barriuso N, Hernández-Porras I, López IP, De Las Rivas J, Pichel JG.** Transcriptome Analysis in Prenatal IGF1-Deficient Mice Identifies Molecular Pathways and Target Genes Involved in Distal Lung Differentiation. Morty RE, ed. *PLoS One* 2013;8(12):e83028.
149. **Tommelein J, De Vlieghere E, Verset L, Melsens E, Leenders J, Descamps B, Debucquoy A, Vanhove C, Pauwels P, Gespach CP, Vral A, De Boeck A, Haustermans K, de Tullio P, Ceelen W, Demetter P, Boterberg T, Bracke M, De Wever O.** Radiotherapy-activated cancer-associated fibroblasts promote tumor progression through paracrine IGF1R activation. *Cancer Res.* 2018;78(3):659–670.
150. **Yau SW, Azar WJ, Sabin MA, Werther GA, Russo VC.** IGFBP-2 - taking the lead in growth, metabolism and cancer. *J. Cell Commun. Signal.* 2015;9(2):125.
151. **Kapp TG, Rechenmacher F, Sobahi TR, Kessler H.** Integrin modulators: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2013. doi:10.1517/13543776.2013.818133.
152. **Sadagurski M, Yakar S, Weingarten G, Holzenberger M, Rhodes CJ, Breitkreutz D, Leroith D, Wertheimer E.** Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2006;26(7):2675–2687.
153. **Rajski M, Zanetti-Dallenbach R, Vogel B, Herrmann R, Rochlitz C, Buess M.** IGF-I induced genes in stromal fibroblasts predict the clinical outcome of breast and lung cancer patients. *BMC Med* 2010;8:1.
154. **Gillery P, Leperre A, Maquart FX, Borel JP.** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates protein synthesis and collagen gene expression in monolayer and lattice cultures of fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992;152(2):389–396.
155. **Shao R, Bao S, Bai X, Blanchette C, Anderson RM, Dang T, Gishizky ML, Marks JR, Wang X.** Acquired Expression of Periostin by Human Breast Cancers Promotes Tumor Angiogenesis through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression Acquired Expression of Periostin by Human Breast Cancers Promotes Tumor Angiogenesis thr. 2004. doi:10.1128/MCB.24.9.3992.
156. **Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G.** Growth promoting signaling by tenascin-C [corrected]. *Cancer Res* 2004;64(20):7377–7385.
157. **New D, Block K, Bhandari B, Gorin YC, Abboud HE.** IGF-1 increases the expression of fibronectin by Nox4-dependent Akt phosphorylation in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011. doi:10.1152/ajpcell.00141.2011.
158. **Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH.** Integrins: Emerging Paradigms of Signal Transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995;11(1):549–599.
159. **Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(1):56–68.
160. **Kumar CC.** Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998;17(11):1365–1373.
161. **Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P.** Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013;1833(12):3481–3498.
162. **van der Flier A, Sonnenberg A.** Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305(3):285–98.
163. **Condic ML, Letourneau PC.** Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 1997;389(6653):852–856.
164. **Weigel KJ, Jakimenko A, Conti BA, Chapman SE, Kaliney WJ, Leevy WM, Champion MM, Schafer ZT.** CAF-Secreted IGFBPs Regulate Breast Cancer Cell Anoikis. *Mol. Cancer Res.* 2014;12(6):855–866.
165. **Mulvihill MJ, Cooke A, Rosenfeld-Franklin M, Buck E, Foreman K, Landfair D, Oconnor M, Pirritt C, Sun Y, Yao Y, Arnold LD, Gibson NW, Ji QS.** Discovery of OSI-906: A selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. *Future Med. Chem.* 2009. doi:10.4155/fmc.09.89.
166. **Brierley G V., Macaulay SL, Forbes BE, Wallace JC, Cosgrove LJ, Macaulay VM.** Silencing of the insulin receptor isoform A favors formation of type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) homodimers and enhances ligand-induced IGF-IR activation and viability of human colon carcinoma cells. *Endocrinology* 2010. doi:10.1210/en.2009-1006.
167. **Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocme E, Liljedahl U, Lagergren J, Larsson O.** SUMOylation Mediates the Nuclear Translocation and Signaling of the IGF-1 Receptor.

- Sci. Signal.* 2010;3(108):ra10-ra10.
168. **Mauro L, Salerno M, Morelli C, Boterberg T, Bracke ME, Surmacz E.** Role of the IGF-I receptor in the regulation of cell-cell adhesion: implications in cancer development and progression. *J Cell Physiol* 2003;194(2):108–116.
  169. **Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA.** Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.* 1994. doi:10.1096/FASEBJ.8.13.7926364.
  170. **Ward PS, Thompson CB.** Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 2012;21:297–308.
  171. **Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, Maxwell R, Stoll EA.** Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro. Oncol.* 2017;19(1):43–54.
  172. **Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, Pinnick KE, Wigfield S, Buffa FM, Li J-L, Zhang Q, Wakelam MJO, Karpe F, Schulze A, Harris AL.** Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 $\alpha$  Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. *Cell Rep.* 2014;9(1):349–365.
  173. **Watanabe R, Wei L, Huang J.** mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. *J. Nucl. Med.* 2011;52(4):497–500.
  174. **Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Johnson J, Blake C, Tlsty T, Vachon CM, Melton LJ, Visscher DW.** Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(3):229–237.
  175. **Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuck A.** Frequent IGF2/H19 Domain Epigenetic Alterations and Elevated IGF2 Expression in Epithelial Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Res.* 2006;4(4):283–292.
  176. **Wu H-K, Weksberg R, Minden MD, Squire JA.** Loss of Imprinting of Human Insulin-like Growth Factor II Gene, IGF2, in Acute Myeloid Leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;231(2):466–472.
  177. **Clément F, Martin A, Venara M, de Luján Calcagno M, Mathó C, Maglio S, Lombardi MG, Bergadá I, Pennisi PA.** Type 1 IGF Receptor Localization in Paediatric Gliomas: Significant Association with WHO Grading and Clinical Outcome. *Hormones and Cancer.* 2018.
  178. **Wisoff JH, Boyett JM, Berger MS, Brant C, Li H, Yates AJ, McGuire-Cullen P, Turski PA, Sutton LN, Allen JC, Packer RJ, Finlay JL.** Current neurosurgical management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's Cancer Group Trial No. CCG-945. *J. Neurosurg.* 1998;89(1):52–59.
  179. **Allen DB.** *Paediatric Endocrinology: 10th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, PES-APEG-APPES-ASPAE-CSPM-ESPE-JSPE-SLEP, Washington, DC, September 2017: Individual Abstracts for Free Communication and Poster Sessions. Supplement Issue: Hormone Research in Paediatrics 2017, Vol. 88, Suppl. 1.* S. Karger; 2017.
  180. **Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A.** Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 2002;277(42):39684–39695.
  181. **Zhao R, DeCoteau JF, Geyer CR, Gao M, Cui H, Casson AG.** Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II (IGF2) gene in esophageal normal and adenocarcinoma tissues. *Carcinogenesis* 2009;30(12):2117–2122.
  182. **Cui H.** Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis. Markers* 2007;23(1–2):105–12.
  183. **Zamykal M, Martens T, Matschke J, Günther HS, Kathagen A, Schulte A, Peters R, Westphal M, Lamszus K.** Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor involves different context-dependent mechanisms. *Neuro. Oncol.* 2015;17(8):1076–85.
  184. **Pollack IF, Hamilton RL, Burger PC, Brat DJ, Rosenblum MK, Murdoch GH, Nikiforova MN, Holmes EJ, Zhou T, Cohen KJ, Jakacki RI, Children's Oncology Group.** Akt activation is a common event in pediatric malignant gliomas and a potential adverse prognostic marker: a report from the Children's Oncology Group. *J. Neurooncol.* 2010;99(2):155–163.
  185. **Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, Romero E, Zheng S, Wiencke JK, McBride**

- SM, Cowdrey C, Prados MD, Weiss WA, Berger MS, Gupta N, Haas-Kogan DA.** PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro. Oncol.* 2012;14(9):1146–1152.
186. **Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, Chaumeil MM, Pieper RO, Phillips JJ, Ronen SM.** Metabolic Reprogramming in Mutant IDH1 Glioma Cells. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0118781.
  187. **Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley M-YC, Yu M, Fisher PG, Rowitch DH, Ford JM, Berger MS, Ji H, Gutmann DH, James CD.** Oncogenic BRAF Mutation with CDKN2A Inactivation Is Characteristic of a Subset of Pediatric Malignant Astrocytomas. *Cancer Res.* 2010;70(2):512–519.
  188. **McIlwain DR, Berger T, Mak TW.** Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(4):a008656–a008656.
  189. **Butt AJ, Firth SM, Baxter RC.** The IGF axis and programmed cell death. In: *Immunology and Cell Biology*.; 1999. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00822.x.
  190. **Pennisi PA, Barr V, Nunez NP, Stannard B, Le Roith D.** Reduced expression of insulin-like growth factor I receptors in MCF-7 breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype. *Cancer Res.* 2002;62(22):6529–37.
  191. **Grzmil M, Hemmerlein B, Thelen P, Schweyer S, Burfeind P.** Blockade of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up-regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression. *J Pathol* 2004;202(1):50–59.
  192. **Malaguarnera R, Belfiore A.** The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2014. doi:10.3389/fendo.2014.00010.
  193. **Penman CL, Faulkner C, Lowis SP, Kurian KM.** Current Understanding of BRAF Alterations in Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targeting in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Front. Oncol.* 2015;5:54.
  194. **Frühwald MC, Rutkowski S.** MEDICINE Tumors of the Central Nervous System in Children and Adolescents. doi:10.3238/arztebl.2011.0390.
  195. **Hiraki Y, Rosen OM, Birnbaum MJ.** Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J. Biol. Chem.* 1988.
  196. **Jensen RL, Chkheidze R.** The Role of Glucose Transporter-1 (GLUT-1) in Malignant Gliomas. In: *Tumors of the Central Nervous System, Volume 1*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011:99–108.
  197. **Agnihotri S, Zadeh G.** Metabolic reprogramming in glioblastoma: The influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro. Oncol.* 2016. doi:10.1093/neuonc/nov125.
  198. **Heiden MG Vander, Cantley LC, Thompson CB.** Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80-. ).* 2009. doi:10.1126/science.1160809.
  199. **Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordat JP, Maire P, Giallongo A.** Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1996. doi:10.1074/jbc.271.51.32529.
  200. **Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu C-S, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang C V.** c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. doi:10.1073/pnas.94.13.6658.
  201. **Fan J, Hitosugi T, Chung T-W, Xie J, Ge Q, Gu T-L, Polakiewicz RD, Chen GZ, Boggon TJ, Lonial S, Khuri FR, Kang S, Chen J.** Tyrosine Phosphorylation of Lactate Dehydrogenase A Is Important for NADH/NAD<sup>+</sup> Redox Homeostasis in Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2011;31(24):4938–4950.
  202. **Fan J, Hitosugi T, Chung T-W, Xie J, Ge Q, Gu T-L, Polakiewicz RD, Chen GZ, Boggon TJ, Lonial S, Khuri FR, Kang S, Chen J.** Tyrosine Phosphorylation of Lactate Dehydrogenase A Is Important for NADH/NAD<sup>+</sup> Redox Homeostasis in Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2011;31(24):4938–4950.
  203. **Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarié A, Tyler BM, Brem H, Toulas C, Moyal ECJ, Sarry JE, Skuli N.** Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* 2015.

- doi:10.1371/journal.pone.0123721.
204. **Reed LJ.** A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.* 2001;276(42):38329–36.
205. **Wieland OH.** The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1983;96:123–70.
206. **Baker JC, Yan X, Peng T, Kasten S, Roche TE.** Marked differences between two isoforms of human pyruvate dehydrogenase kinase. *J. Biol. Chem.* 2000. doi:10.1074/jbc.M909488199.
207. **Huang B, Gudi R, Wu P, Harris RA, Hamilton J, Popov KM.** Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J. Biol. Chem.* 1998;273(28):17680–8.
208. **Assimacopoulos-Jeannet F, McCormack JG, Prentki M, Jeanrenaud B, Denton RM.** Parallel increases in rates of fatty acid synthesis and in pyruvate dehydrogenase activity in isolated rat hepatocytes incubated with insulin. *BBA - Gen. Subj.* 1982. doi:10.1016/0304-4165(82)90383-X.
209. **JOHNSON S, DENTON R.** Insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase in adipocytes involves two distinct signalling pathways. *Biochem. J* 2003. doi:10.1007/s12192-010-0223-9.
210. **Krebs HA.** The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspect. Biol. Med.* 1970;14(1):154–172.
211. **Nazaret C, Heiske M, Thurley K, Mazat J-P.** Mitochondrial energetic metabolism: A simplified model of TCA cycle with ATP production. *J. Theor. Biol.* 2009;258(3):455–464.
212. **Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV.** Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metab.* 2013;18(2):153–161.
213. **Tao BB, He H, Shi XH, Wang CL, Li WQ, Li B, Dong Y, Hu GH, Hou LJ, Luo C, Chen JX, Chen HR, Yu YH, Sun QF, Lu YC.** Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. *J. Clin. Neurosci.* 2013. doi:10.1016/j.jocn.2012.03.050.
214. **Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP.** Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer* 2013;13(4):227–32.
215. **Farese R V., Walther TC.** Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.11.005.
216. **Samoilov M, Plyasunov S, Arkin AP.** Stochastic amplification and signaling in enzymatic futile cycles through noise-induced bistability with oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. doi:10.1073/pnas.0406841102.
217. **Grube S, Göttig T, Freitag D, Ewald C, Kalff R, Walter J.** Selection of suitable reference genes for expression analysis in human glioma using RT-qPCR. *J. Neurooncol.* 2015;123(1):35–42.
218. **Sarbassov DD, Sabatini DM.** Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J. Biol. Chem.* 2005. doi:10.1074/jbc.M506096200.
219. **Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS.** mTOR signaling in glioblastoma: Lessons learned from bench to bedside. *Neuro. Oncol.* 2010. doi:10.1093/neuonc/nuq052.
220. **Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G.** Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor. *Science (80-. )*. 2001. doi:10.1126/science.1063518.
221. **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 2007;129(7):1261–1274.
222. **Kim J, Guan K-L.** Amino Acid Signaling in TOR Activation. *Annu. Rev. Biochem.* 2011. doi:10.1146/annurev-biochem-062209-094414.

*Anexos*

ARN	Secuencia del cebador (5'-3')	Conc (nM)	Tm (°C)	Tamaño (bp)
IGF-1R	f: AGTCTGCGGCGATGAAGAGAAGAA	900	59.9	216
	r: AAGGACAAGGAGACCAAGGCATGA	900	60	
TGF $\beta$	f: CTAATGGTGGACCGCAACAAC	600	59.8	147
	r: TAATCTCTGCAAGCGCAGCTC	600	61.07	
IGF-1	f: CACATCATGTCGTCTTCACACC	900	59.59	220
	r: GGAAGCAACACTCATCCACAATG	900	60.37	
COL I	f: CATGACCGATGGATTCCCGTTC	600	61.38	140
	r: AGGCTACGCTGTTCTTGCACTG	600	63.36	
ELN	f: GAAAGCCTGGGAAAGTTCCTGGTG	900	63.88	133
	r: TTGGCTTTGACTCCTGTGCCAGTG	900	65.59	
POSTN	f: CCATGTTTATGGCACGCTGG	600	59.9	249
	r: CCGTGTTTCAGGTCCTTGGT	600	60.18	
TNC	f: GTTTGGACCGCAGAGAAGAA	900	58.12	342
	r: TGTCCCCATATCTGCCCATCA	900	60.7	
FN	f: CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	900	58.76	130
	r: AAACCTCGGCTTCCTCCATAA	900	59.09	
HPRT	f: AGTTCTTTGCTGACCTGCTG	900	58.4	127
	r: TTTATGTCCCCCGTTGACTG	900	57.52	
ITG $\alpha$ V	f: CACGTCCTCCAGGATGTTTCTC	900	60.68	130
	r: AAACCTCAATGGGCTGGCACC	900	61.19	
ITG $\beta$ 1	f: TCCCAAGTTTCAAGGGCCAA	900	59.74	126
	r: TCCTGTGCACACGTGTCTTT	900	60.11	
ITG $\beta$ 3	f: TTGGCCTTGCTACTCTGCTC	300	60.04	114
	r: GGTTGTTTGCTGTGTCCAC	300	59.9	

**Tabla suplementaria 1: secuencias de cebadores para detectar expresión de genes en muestras de ratón (fibroblastos o líneas celulares).** Se informa la concentración en la que fueron usados, temperatura de "melting" para cada uno y longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos amplificados en cada caso.

ARN	Secuencia del cebador (5'-3')	Conc (nM)	Tm (°C)	Tamaño (bp)
IGF-2	f: GGACACCCTCCAGTTCGTCT	900	61.69	171
	r: GACACGTCCCTCTCGGACT	900	60.67	
IGF-1	f: CAGCAGTCTTCCAACCCAAT	300	58.08	197
	r: CCCTGTCTCCACACACGAAC	300	60.60	
IGF-1R	f: GCAACCACGAGGCTGAGAAG	300	61.29	100
	r: GTCACTGGCCCAGGAATGTC	300	61.29	
IR	f: CAGGACCTGCACCACAAATG	900	59.40	197
	r: GTCACCGAGTCGATGGTCTT	900	59.47	
GLUT 1	f: GGTTGTGCCATACTCATGACC	900	59.74	66
	r: CAGATAGGACATCCAGGGTAGC	900	60.11	
TBP	f: GATCAAACCCAGAATTGTTCTCC	900	57.68	134
	r: ATGTGGTCTTCCTGAATCCCTTT	900	59.67	

**Tabla suplementaria 2: secuencias de cebadores para detectar expresión de genes en muestras humanas (tumores o líneas celulares).** Se informa la concentración en la que fueron usados, temperatura de "melting" para cada uno y longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos amplificados en cada caso.

---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ADOLESCENTE (13 a 17 años) con asistencia de padres****PROTOCOLO: SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMILES EN LESIONES OCUPANTES DE ESPACIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS: CORRELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA**

Investigadores Principales: Dra Florencia Clément, Dra. Patricia Pennisi.

Las lesiones ocupantes de espacio del Sistema Nervioso Central son relativamente frecuentes en los niños a pesar de lo cual, en la mayoría de los casos, todavía no se sabe por qué se desarrollan.

Los investigadores que estudian esta enfermedad han descubierto que unas proteínas llamadas factores de crecimiento insulino-símiles participan en el crecimiento de las lesiones ocupantes de espacio del cerebro.

Lo que nosotros queremos conocer con el estudio en el que te invitamos a participar es si las células que forman estas lesiones cerebrales de los niños, tienen estas proteínas, en qué cantidad las producen y si esto tiene relación con la gravedad de la enfermedad. Con estos conocimientos quizá en el futuro podamos encontrar nuevos tratamientos para otros niños que tengan la misma enfermedad.

Si decidís participar de este estudio lo único que nosotros haremos será tomar un pedacito del tejido (muestra) en el momento en que los neurocirujanos te lo saquen. La muestra será procesada en nuestro laboratorio y la conservaremos en el mismo a -70 °C, durante un periodo máximo de 20 años, descartándose luego según las normas vigentes. También tomaremos un poco (1 cm<sup>3</sup>) de la muestra de sangre que se toma para los análisis que se hacen antes de la cirugía y la usaremos para medir los mismos factores de crecimiento que se estudian en el tejido.

Después que te vayas de alta, nos informaremos de los resultados de los controles que realices cada vez que vengas al hospital para saber cómo estás. Toda la información que obtengamos de este estudio será anónima, o sea que nadie podrá saber tu nombre. Para que sea anónima, no la identificaremos con tu nombre, sino con un código, que conocerá solamente el investigador responsable de este estudio.

Solicitamos tu autorización en presencia de tu/s Padre/Madre ó representante legal a quien/es también hemos informado sobre este estudio, para ingresarte como participante del mismo. Tu participación es voluntaria. Podés negarte a participar, o arrepentirte luego de haber firmado y retirarte del estudio en cualquier momento que lo desees, así como solicitar la destrucción de las muestras de tejido extraídas. Esto no afectará en absoluto la atención médica que recibís.



En caso de que aceptes participar, todos los resultados que se obtengan te serán comunicados cuando lo solicites y podrán ser publicados en revistas de reconocimiento científico. Sin embargo, garantizamos que tu identidad permanecerá reservada ya que la confidencialidad de los datos se regirá por la Ley 25.326 de Protección de los datos personales, de Octubre del Año 2000. Si aceptás, te pedimos que firmes al final.

Muchas gracias!

Buenos Aires,.....de ..... 20....

**Doy mi consentimiento en presencia de alguno de mis padres o representante legal.**

.....  
Firma del paciente

.....  
Firma del médico

DNI.....

MN.....

.....  
Firma del padre/madre/tutor DNI.....

---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PADRE, MADRE O TUTOR DE MENORES DE 13 AÑOS****PROTOCOLO: SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMILES EN LESIONES  
OCUPANTES DE ESPACIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS:****CORRELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA**

Investigadores Principales: Dra. Florencia Clément, Dra. Patricia Pennisi.

**Consentimiento informado**

Las lesiones ocupantes de espacio del Sistema Nervioso Central son relativamente frecuentes en la niñez a pesar de lo cual, en la mayoría de los casos, todavía no se sabe por qué se desarrollan. Su hijo/a padece una de estas lesiones y se le están programando estudios para indicar el tratamiento específico. Dentro de estos estudios algunos van a ser realizados en el tejido que se obtenga durante la cirugía para saber qué tipo de lesión presenta su hijo/a.

Actualmente se están investigando los factores de crecimiento insulino-símiles, que son una familia de proteínas que participan en la multiplicación de las células tanto en los tejidos normales como en los dañados.

El objetivo del estudio en el que su hijo/a está siendo invitado a participar es determinar la existencia de estos factores de crecimiento insulino-símiles en las lesiones ocupantes de espacio del Sistema Nervioso Central de pacientes pediátricos, cuantificarlos y establecer si existe una asociación entre los mismos y la gravedad de la enfermedad al momento del diagnóstico y en su evolución. Esto podría ser utilizado en el futuro para establecer parámetros pronósticos de la enfermedad, así como nuevas alternativas de tratamiento.

Si Ud./Uds. decide/n que su hijo/a participe de este protocolo nosotros tomaremos, en el momento de la cirugía, una muestra del tejido que se le extraiga (además de la que se envía a Anatomía Patológica), la cual procesaremos en nuestro laboratorio y conservaremos en el mismo a -70 °C, durante un periodo máximo de 20 años, descartándose luego según las normas vigentes para descarte de materiales biológicos. Por otro lado, de la muestra de sangre que se toma para los análisis de rutina antes de la cirugía, se separará una pequeña cantidad (1 cm<sup>3</sup>) para medir los mismos factores de crecimiento que se estudian en el tejido.

Posteriormente realizaremos un seguimiento de la evolución de su hijo, a través de los controles habituales que se realizan a los niños con esta patología. La información se manejará en el marco de una muestra relativa a personas identificables (Res. N° 595/MSGC/2014), es decir que la misma será codificada de manera que permita su decodificación. Este estudio no implica para su hijo ningún procedimiento extra, ni tiene costos adicionales para Ud. o su familia.

Queremos aclarar que la aceptación para participar en este estudio no es obligatoria, y Ud./Uds puede/n negarse o habiendo firmado este consentimiento retirarse del estudio así como solicitar la destrucción de las muestras de tejido extraído en cualquier momento que lo desee/n. Esto no afectará de manera alguna la atención médica que su hijo/a necesite.

En caso de que acepte/n participar, todos los resultados que se obtengan le serán comunicados, si usted/es así lo solicita/n, y podrán ser publicados en revistas de reconocimiento científico. Sin embargo, garantizamos que su identidad permanecerá reservada ya que la confidencialidad de los datos se regirá por la Ley 25.326 de Protección de los datos personales, de Octubre del Año 2000.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Docencia y el Comité de Ética en Investigación de este hospital.

Si Ud. acepta que su hijo/a participe del mismo, rogamos que firme al pie, ratificando así su decisión.

Ante cualquier duda puede comunicarse con:

Dra. Florencia Clément, División de Endocrinología, Tel: 4963-5931 o concurrir al Comité de Ética en Investigación de nuestro hospital en Gallo 1330,  
Muchas gracias!

#### CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO:

Yo/nosotros..... abajo firmante/s, he/hemos  
sido informado/s acerca del objetivo y características del presente estudio.

Por la presente doy/damos mi/nuestro consentimiento para que mi/nuestro  
hijo/a

.....participe  
libremente y de manera espontánea.

Buenos Aires,.....de ..... 20....

.....  
Firma del padre/madre/tutor

.....  
Firma del médico

DNI.....

MN.....



